

嗅覚連合記憶を司るキノコ体外部神経の機能解析

著者	市之瀬 敏晴
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16678号
URL	http://hdl.handle.net/10097/62679

博士論文

市之瀬敏晴

嗅覚連合記憶を司るキノコ体外部神経の機能解析

本研究は、Max Planck Institute of Neurobiology、東北大学生命科学研究科において、谷本拓教授の指導のもと行った。

目次

要約 p3

序章 p4-p9

結果

第1章：自動学習実験装置の作製と野生型ショウジョウバエの行動解析 p10-p17

第2章：罰・報酬学習に必要なキノコ体出力神経の網羅的探索 p18-p27

第3章：フィードバック報酬回路を介した長期報酬記憶形成機構 p28-p45

考察 p46-p54

材料と方法 p55-p59

謝辞 p60

参考文献 p61-p70

要約

本研究はショウジョウバエの連合記憶をモデルとして、独自に開発した学習実験系と最新の遺伝学ツールを用いてその神経細胞メカニズムを解明したものである。第一に、嗅覚連合記憶の大規模行動実験を効率良く行うための実験装置を開発した。匂いと電気ショックの連合学習を自動で行う装置と、嗅覚連合記憶スコアを自動で算出するシステムを開発し、行動実験の大幅な簡便化による効率改善を実現した。また、記憶テスト時の匂い選択行動の画像解析により、従来の方法では不可能であった記憶読み出し行動の詳細な解析を可能とした。第二にこの実験装置を用い、嗅覚罰記憶と嗅覚報酬記憶について連合記憶中枢であるキノコ体からの出力回路の機能解析を行った。その結果、罰記憶と報酬記憶で異なる出力神経細胞種が必要であることを明らかにした。この結果は、罰記憶と報酬記憶がキノコ体の異なる区画から読み出され、脳の異なる領域へ伝達されるというモデルを支持する。第三に長期報酬記憶が、フィードバック報酬回路によってキノコ体の特定領域に形成されるメカニズムを示した。このフィードバック回路は、特定のキノコ体内部神経、キノコ体出力神経、報酬系ドーパミン神経から構成される。このフィードバック報酬回路は、報酬学習および学習直後の時間帯に活動することが長期記憶の形成および固定化に必要であった。また長期記憶の痕跡は、ドーパミン受容体 *DopR1* を通してキノコ体内部神経で形成されることを示した。以上の結果から、キノコ体の特定領域で形成された記憶痕跡がフィードバック報酬回路を通して長期記憶へと形を変えるというモデルを提案する。

序論

動物は外界の情報を受容し、それに応じた行動を出力する。これは生得的行動と経験依存的な学習行動とに分類することができる。刻々と変化する自然界において、経験依存的な学習行動は非常に重要である。とりわけ異なる二つの刺激を関連づけて記憶する連合学習は、無脊椎動物から脊椎動物まで様々な動物で広く知られる行動である。しかし中枢神経系においてこのような記憶が処理される神経回路メカニズムについては、その大部分が不明である。

近年、ショウジョウバエの遺伝学を活用した神経細胞の機能解析が大きな成功を収めている。ショウジョウバエを用いる主な利点として、(1) GAL4/UASシステム (Brand and Perrimon, 1993)を用いた細胞種特異的な機能操作により、自由行動下で非侵襲的に神経活動を操作できること、(2)脳を構成する神経細胞数が約10万個と脊椎動物と比べて少ないため解析が容易であること、(3)神経回路レベルで脊椎動物と高い類似性が見られること (Tomer et al., 2010)、が挙げられる。

本研究はショウジョウバエの連合記憶をモデル系として用い、連合記憶が形成され読み出される神経細胞学的メカニズム全貌を、その中枢として知られるキノコ体に着目して明らかにすることを目的とした。

連合記憶とキノコ体

ショウジョウバエは様々な刺激を受容し、それを組み合わせて連合記憶を形成できる。匂いと電気ショック罰 (Quinn et al., 1974; Tully and Quinn, 1985)、匂いと砂糖報酬 (Tempel et al., 1984)を連合させた嗅覚連合学習は古くから研究が行われてきた (図0-1)。また、匂いとエタノール報酬 (Kaun et al., 2011)、匂いと水報酬 (Lin et al., 2014)、色と砂糖報酬 (Schnaitmann et al., 2010)、色と電気ショック罰 (Vogt et al., 2014)、を組み合わせた連合学習も可能である。この他にも、ショウジョウバエの脚に甘味物質を提示すると吻を伸ばして甘味物質を摂取しようとするが (吻伸展反射、(Dethier, 1976))、代わりに苦味物質

を吻に与えると吻伸展反射が抑制されるという罰学習や (Masek and Scott, 2010)、雄が交尾済みの雌に求愛行動を行うと拒絶され次の求愛行動が抑制されるという求愛学習 (Siegel and Hall, 1979)も成立する。興味深いことに、これらの多様な学習行動は全てキノコ体という単一の神経構造によって担われている (Aso et al., 2014b; de Belle and Heisenberg, 1994; Dubnau et al., 2001; Heisenberg et al., 1985; Kaun et al., 2011; Keleman et al., 2007; Keleman et al., 2012; Lin et al., 2014; Masek et al., 2010; Masek et al., 2015; McGuire et al., 2001; Vogt et al., 2014)。キノコ体は、どのように様々な記憶を処理しているのでしょうか。この疑問に答えるためには、キノコ体に入力、出力する神経の機能を明らかにすることが必要である。本研究では匂いと電気ショックを用いた嗅覚罰記憶と、匂いと砂糖を用いた嗅覚報酬記憶に着目して、キノコ体への入力及び出力に関わる神経を解明した。その結果、罰記憶と報酬記憶が、キノコ体の異なる領域から異なる神経細胞によって出力されることが明らかになった。次に嗅覚報酬記憶に着目し、長期記憶がキノコ体の特定領域にフィードバック報酬回路を通して形成される神経細胞メカニズムを明らかにした。以上の成果により、区画化されたキノコ体が複数の異なる記憶を処理する細胞メカニズムの一端が明らかになったといえる。

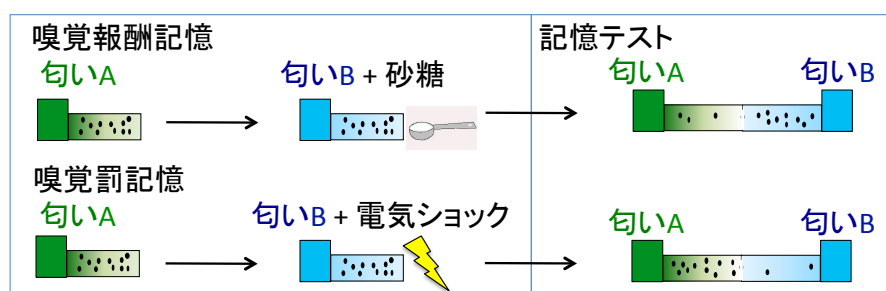


図 0-1 ショウジョウバエにおける嗅覚連合学習

報酬記憶により記憶した匂いに対する誘引行動が（上段）、罰記憶により忌避行動が（下段）引き起こされる。

キノコ体の構造

近年の詳細な解剖学的研究によって、ショウジョウバエのキノコ体を構成する神経回路がほぼ明らかになっている (Aso et al., 2014; Mao and Davis, 2009; Pech et al., 2013; Tanaka et al., 2008)。キノコ体は、その形態の違いから α/β , α'/β' , γ 細胞に大まかに分類される約2,000個のケニオン細胞から構成される。 α/β ケニオン細胞は投射様式の違いによりさらに細かく c (core), s (surface), p (posterior) の三種に、 α'/β' ケニオン細胞は m (middle), a/p (anterior/posterior) の二種に、 γ ケニオン細胞は main, d (dorsal) の二種に分類される (Aso et al., 2009; Aso et al., 2014; Tanaka et al., 2008)。ケニオン細胞は peduncle と呼ばれる束になった並行繊維を脳の前方向に向かって伸ばし、 α/β ケニオン細胞は α 葉と β 葉を、 α'/β' ケニオン細胞は α' 葉と β' 葉を、 γ ケニオン細胞は γ 葉をそれぞれ形成する (図0-2)。これら多数のケニオン細胞は、葉部で出力神経の樹状突起に神経接続する (図0-2、出力神経)。葉部は15の区画に分割され (図0-2、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ など)、それぞれの区画に一種類ないし二種類の出力神経が樹状突起を伸ばす。出力神経細胞種は全部で21種類見つかり、全体でキノコ体の葉部をカバーする (図0-3) (Aso et al., 2014)。ほとんどの出力神経細胞種は1個または2個の細胞から構成され、各細胞がそれぞれ数百のケニオン細胞からの入力を統合する (後述、p8)。一方、キノコ体葉部には、PAM, PPL1, PPL2ab という三つの細胞クラスターに分類される20種類のドーパミン入力神経が軸索終末を投射する (図0-2、ドーパミン入力神経) (Aso et al., 2014)。ドーパミン入力神経の各細胞種も出力神経と同様、特定の区画にのみ投射し、全体でキノコ体葉部をカバーする。各ドーパミン細胞種は、ケニオン細胞と出力神経の神経接続を調節すると考えられている (Boto et al., 2014; Gervasi et al., 2010; Tomchik and Davis, 2009)。

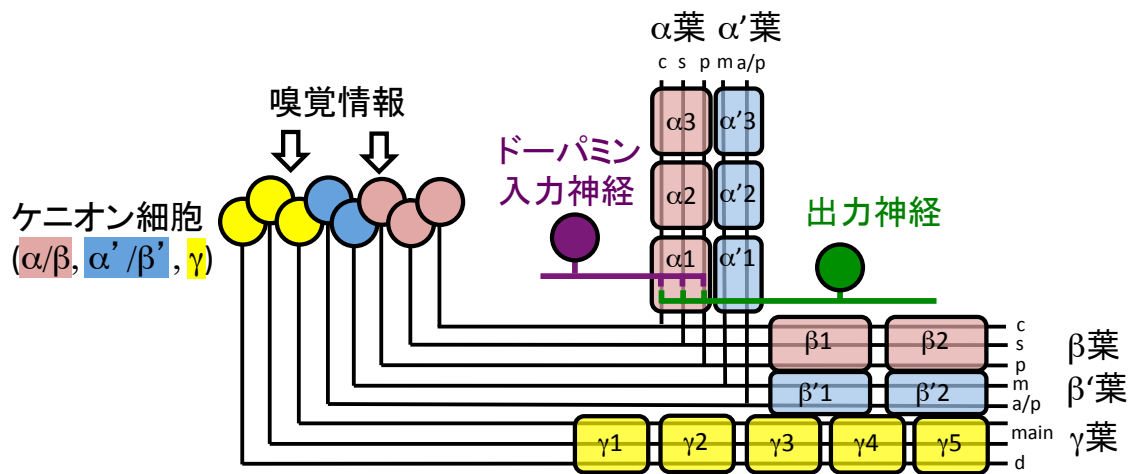


図 0-2 キノコ体の構造

ケニオン細胞は嗅覚二次神経からの入力を受け取り、peduncle と呼ばれる並行繊維を脳の前方に伸ばす。 α/β 細胞、 α'/β' 細胞は二股に分岐し、それぞれ α 葉と β 葉、 α' 葉と β' 葉を形成する。 α 葉と α' 葉は背腹軸に沿って伸び、 β 葉、 β' 葉、 γ 葉は左右軸に沿って伸びる。葉部には多種類のドーパミン入力神経と出力神経が投射し、その投射パターンによってキノコ体は区画化される。Aso et al., 2014a, Figure1 を改変。

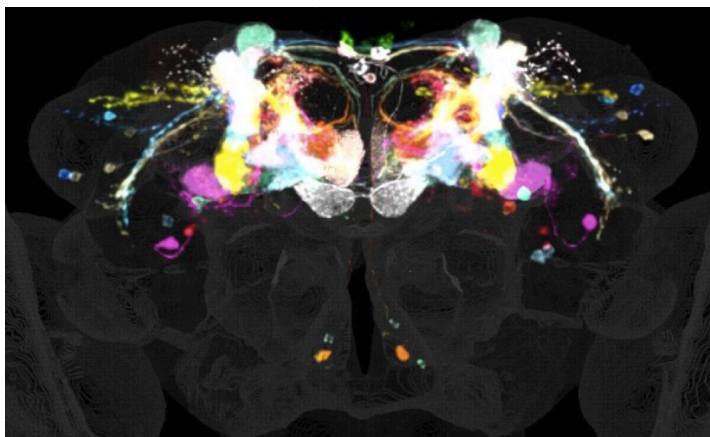


図 0-3 キノコ体出力神経

各キノコ体出力神経細胞種の共焦点画像を image registration 法 (Guizar-Sicairos et al., 2008) により重ね合わせ、それぞれ異なる色でラベルしたもの。キノコ体葉部全体が、異なる領域に投射する出力神経によってタイルされていることがわかる。麻生能功博士による提供。

キノコ体における嗅覚連合記憶の処理機構

ケニオン細胞は嗅覚二次神経から嗅覚情報を受容する。匂いの種類に応じて異なるケニオン細胞のセットが活動することから、ケニオン細胞の活動パターンが匂い情報をコードすると考えられている (Campbell et al., 2013; Honegger et al., 2011; Turner et al., 2008)。出力神経は多数のケニオン細胞からの入力を受けるためケニオン細胞と異なり、各細胞が非常に広汎な匂いに応答する (Sejourne et al., 2011)。ドーパミン入力神経は、砂糖報酬や電気ショック罰の情報をキノコ体に伝達する (Burke et al., 2012; Liu et al., 2012; Schwaerzel et al., 2003)。興味深いことに、砂糖報酬と電気ショック罰はキノコ体の異なる領域に投射する別々の入力神経によって伝達される (Liu et al., 2012; Schwaerzel et al., 2003)。ケニオン細胞の匂い刺激による発火とドーパミン入力神経からの入力が同期することにより、ケニオン細胞と出力神経のシナプスが可塑的に変化すると考えられている (Boto et al., 2014; Gerber et al., 2004; Gervasi et al., 2010; Tomchik and Davis, 2009; Waddell, 2013)。すなわち連合記憶の形成は、ケニオン細胞とドーパミン入力神経の同時活性化による出力の可塑的な変化と捉えることができる。

ケニオン細胞が嗅覚連合学習に重要な役割を果たすことは古くから研究されてきた (de Belle and Heisenberg, 1994; Dubnau et al., 2001; Heisenberg et al., 1985; McGuire et al., 2001)。近年では個々のケニオン細胞サブタイプ (α/β , α'/β' , γ ケニオン細胞) が異なる機能をもつことについて研究が進んでいる：短期記憶と長期記憶、麻酔耐性記憶 (Quinn et al., 1974; Tully et al., 1994) がそれぞれ異なるケニオン細胞から読み出されること (Cervantes-Sandoval et al., 2013; Isabel et al., 2004; Pascual and Preat, 2001; Trannoy et al., 2011)、連合記憶の素過程 (記憶の形成、固定化、読み出し) がそれぞれ別のケニオン細胞によって制御されること (Huang et al., 2012; Krashes et al., 2007)、報酬記憶と罰記憶が一部異なるケニオン細胞から読み出されること (Perisse et al., 2013) などが報告されている。キノコ体に投射するドーパミン入力神経についても複数の報告がある：罰情報の伝達について、特定の細胞クラスターが必要で

あること (Aso et al., 2012; Aso et al., 2010; Claridge-Chang et al., 2009; Schwaerzel et al., 2003)、報酬情報の伝達に、罰情報を伝達する細胞とは異なる細胞群が必要であること (Burke et al., 2012; Liu et al., 2012)が報告された。出力神経については二つの細胞種について報告があった： α 葉と α' 葉からの特定の出力神経群が嗅覚罰記憶の読み出しに必要であるという報告 (Sejourne et al., 2011)、また、 $\alpha 3$ 区画から出力する細胞種が長期報酬記憶、長期罰記憶の読み出しに必要であるという報告である (Pai et al., 2013; Placais et al., 2013)。しかし、その他の出力神経の機能については未報告であった。本研究では嗅覚報酬記憶と嗅覚罰記憶がキノコ体によって処理される神経回路メカニズムを明らかにするため、嗅覚報酬記憶と嗅覚罰記憶に必要な出力神経とドーパミン入力神経を単一細胞種レベルでそれぞれ明らかにすることを目標とした。このためには非常に大規模な行動実験が必要となるので、高効率で行動実験を行うための実験装置を開発した。結果の第1部ではこの実験装置開発について述べる。

結果

第1部：自動学習実験装置の作製と野生型ショウジョウバエの行動解析

電気ショックと匂いを用いた嗅覚罰学習はショウジョウバエにおいて安定した連合記憶を形成することから、連合学習のモデルとして広く研究が行われてきた (Quinn and Dudai, 1976; Quinn et al., 1974; Tully et al., 1994; Tully and Quinn, 1985)。この学習系では、内側に二本のコイルが巻かれた電気ショックチューブに数十匹のショウジョウバエを入れ、匂いと電気ショックを同時に与えることで罰記憶を形成する (図0-1)。連合記憶テストでは、電気ショックと連合させた匂いを片方に含んだT迷路の中にショウジョウバエを入れ、どちらの匂いに個体が集まったかをカウントし、記憶スコアを計算する (図0-1、後述、p12)。従来の実験装置では、電気ショックや匂いの提示、T迷路における匂い選択行動の数値化は全て人為作業で行われ、研究遂行のボトルネックであった。大規模な行動実験を効率よく行うためには、これらの作業を自動化することが有効である。

電気ショック匂い連合学習を行う自動実験装置の作製

ここでは匂いと電気ショックを連合させる学習実験を自動化する実験装置の開発を報告する。匂いと電気ショックを提示するタイミングをコンピュータで一元的にコントロールすることで実験操作の自動化を試みた。匂い提示のコントロールには三方電磁弁を用いた。実験装置の模式図を図1-1に示す。実験に使用するショウジョウバエが入った電気ショックチューブ4本に送風機が逆向きにつながれ、空気の流れを作る。このチューブの上流に二つの三方電磁弁をつなぎ、空気の流路を、匂い溶液の入ったカップあるいは溶媒の入ったカップとの間で開閉する (図1-1、図1-2)。電磁弁の開閉、電気ショックのON/OFFはLabviewをベースとしたソフトウェア (図1-3) でコントロールする。

以上の実験装置により、匂い電気ショック学習を完全に自動化した。装置一台につき、4グループのショウジョウバエ実験群を同時に学習させることができる。

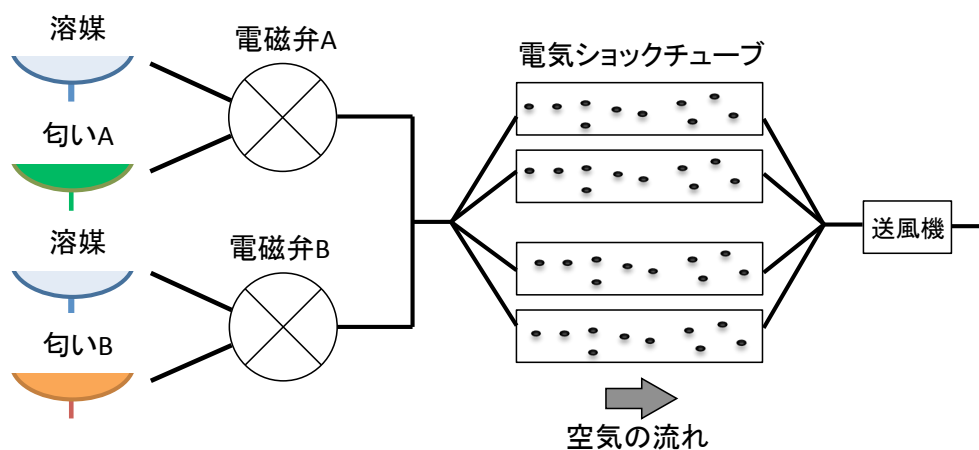


図 1-1 自動学習装置

4本のショックチューブにショウジョウバエを入れ、送風機につなぐ。上流に三方電磁弁および匂いカップをつなぐ。電磁弁を匂いカップ方向に開くことで匂いを提示する。電気ショックのON/OFF、各電磁弁の開閉はコンピューターが制御する。

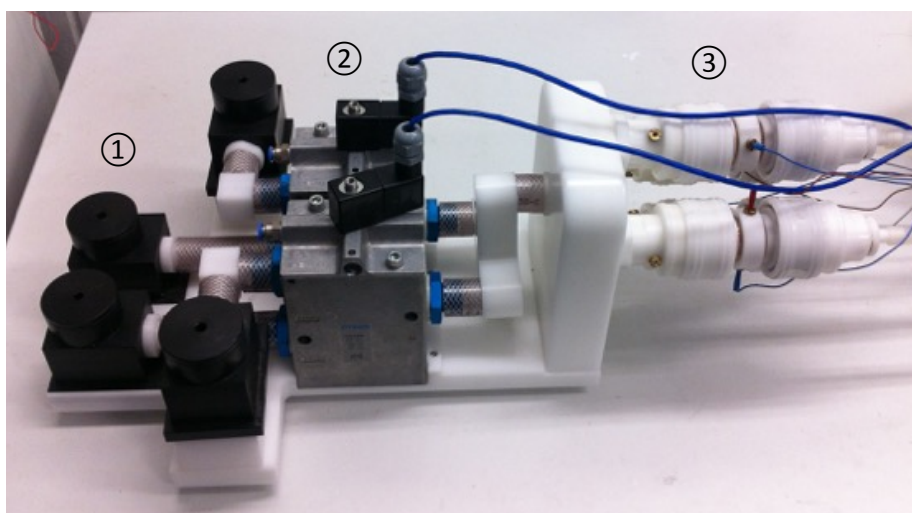


図 1-2 自動学習装置の外観

①匂いカップ②電磁弁③電気ショックチューブ

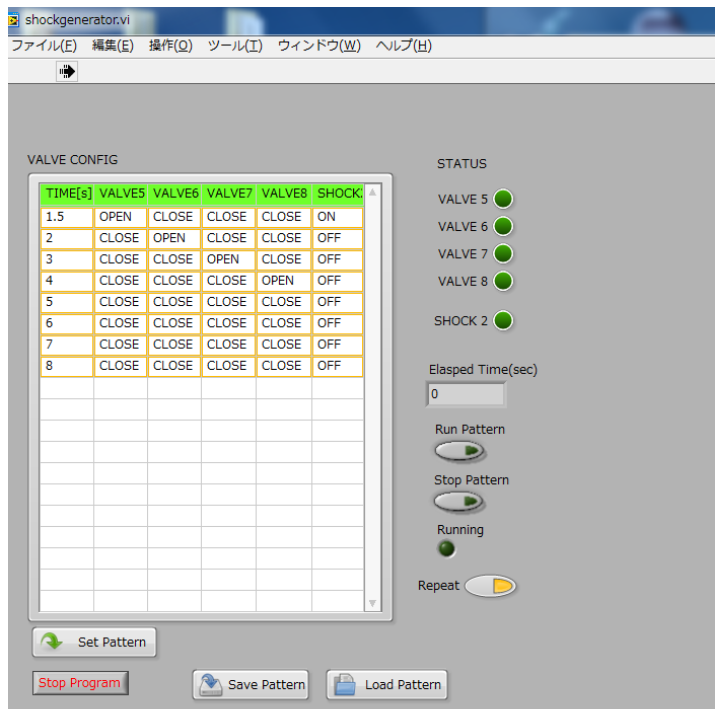


図 1-3 自動学習装置のコントロール画面

各電磁弁の開閉、電気ショック提示のタイミングを自由にプログラムできる。

嗅覚連合記憶テストを行う自動実験装置の作製

ショウジョウバエの嗅覚記憶テストは、T迷路の中で条件付けされた匂い（CS+）と条件付けされていない匂い（CS-）から一つを選択させ（図0-1）、以下の計算式に基づいて記憶スコアを計算する（Quinn et al., 1974）。

記憶スコア = (CS+を選択したハエの数 - CS-を選択したハエの数) / ハエの総数

全てのハエがCS+を選択した場合記憶スコアは1に、全てのハエがCS-を選択した場合は-1になる。従来の嗅覚記憶テストでは、匂い選択行動を一定時間（多くの場合120秒）行わせ、それぞれの匂いを選択した個体を実験者が回収し、個体数をカウントすることにより上記の記憶スコアを定量する（Tully and Quinn, 1985）。特定の匂いによる選択バイアスを避けるため二種類の匂いを用

い、各々をCS+として用いた時の記憶スコアを平均する。この方法を用いて記憶に必要な遺伝子や神経回路が多数同定されてきた (Keene and Waddell, 2007)。しかし、この方法ではT迷路内での匂い選択行動の詳細な解析は不可能であり、実験効率も低い。そこで私は透明なテストチューブを用い、ショウジョウバエ匂い選択行動を撮影し、その画像を自動解析するシステムを開発した (図1-4)。通常ショウジョウバエの嗅覚記憶テストは暗闇で行うため、下から赤外線照射し (ショウジョウバエには赤外線は見えないとされている (Salcedo et al., 1999))、その影を上部に設置したカメラで撮影する。別個体の影が互いに重なるのを防ぐため、テストチューブの壁部と天井部にFluonを塗った (図1-4)。Fluonは表面の摩擦を最小化することにより昆虫が壁に登るのを防ぐ効果がある。また、一台のカメラで複数のテストチューブの底部撮影を可能にするため、台形の断面にした (図1-4 B)。

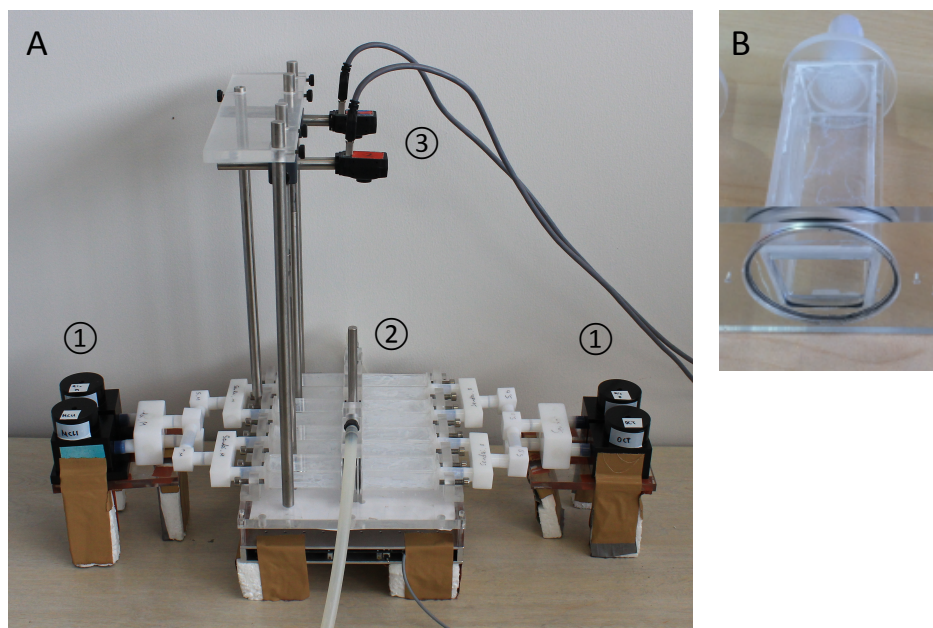


図 1-4 テスト装置

(A) 全体像。①匂いカップ②T 迷路③カメラ

連合された嗅覚刺激に対する忌避行動、誘引行動を自動分析する。匂い選択チューブは下から赤外線の照射を受け、カメラはハエの影を検出する。動画解析カスタムソフトウェアによって自動でスコア化される。

(B) テストチューブの断面図。壁部と天井部に Fluon (白く見える) を塗ることによりハエが壁を登るのを防ぐ。断面が台形であるため一台のカメラで複数のテストチューブを撮影できる。

撮影された画像は独自に開発したimageJマクロにより自動解析する(図1-5)。具体的には、ハエが匂い選択行動を行っている画像(図1-5、上段左)からハエの入っていない画像(図1-5、上段中央)を引き算し、ハエの影を検出する(図1-5、上段右、下段)。この方法により、画像から実験者がハエをカウントした場合と比較して95%以上の正確性でハエの影を検出することができる。

以上の装置を用いて、記憶テスト時におけるショウジョウバエの匂い選択行動を毎秒一枚撮影し、各アームを選択した個体数から各秒における記憶スコアを自動計算するシステムを構築した。従来の方法では一定時間後の個体分布しか知ることができなかったが、この装置により記憶テスト開始から毎秒の記憶スコアを得ることができる。

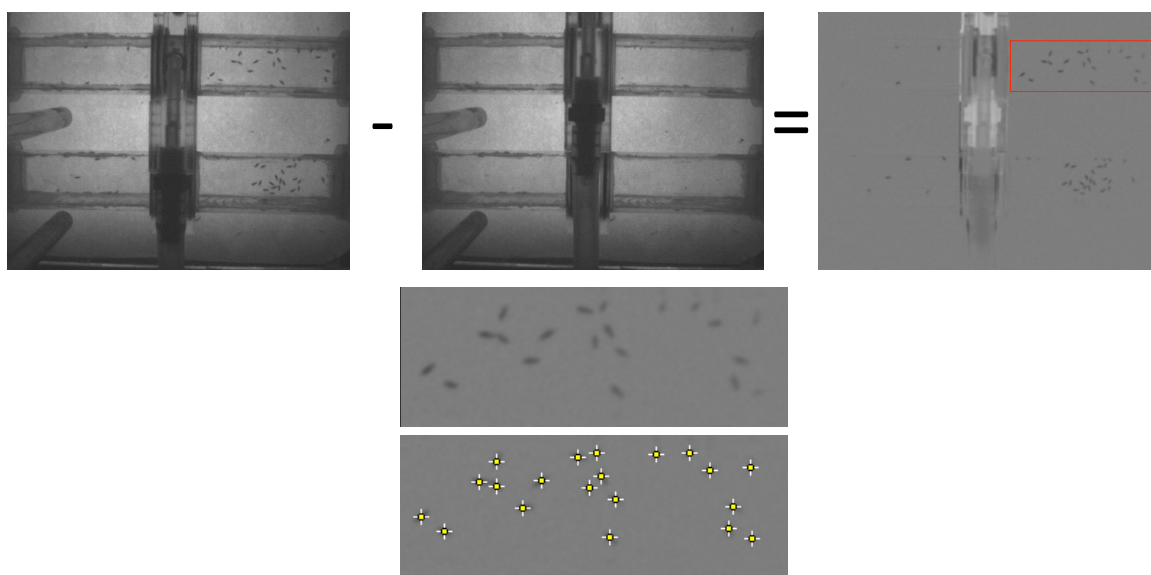


図 1-5 画像処理

上段左：ショウジョウバエが匂い選択行動を行っている画像。

上段中央：ショウジョウバエの入っていないバックグラウンド画像。

上段右：引き算された画像。

中段：上段右の赤枠部分の拡大図。

下段：上記画像からハエの影として検出されたドット。

野生型ショウジョウバエの行動解析

上記の自動電気ショック学習装置を用いて野生型ショウジョウバエに対し嗅覚罰記憶を形成させ、嗅覚記憶テスト装置を用い、学習後5分、1時間、2時間、4時間、8時間の時点における記憶スコアをそれぞれ測定した。図1-6にその結果を示す。横軸はテスト開始後の時間（秒）、縦軸は記憶スコアである。ショウジョウバエがCS+を忌避するので記憶スコアは負の値となる。テスト開始後120秒（一般的に用いられているテスト時間、グラフ右端）の値は先行研究とほぼ同様のスコアを示した（Tully et al., 1994; Tully and Quinn, 1985）。この装置を用いることにより実験を簡便化するとともに、ショウジョウバエの匂い選択行動を高い時間解像度で解析することが可能になった。図1-6の結果より、テスト開始直後の匂い選択はランダムに近いが徐々にCS+を忌避する個体が増え、テスト開始60秒後にはほぼ平衡状態に達することがわかる。

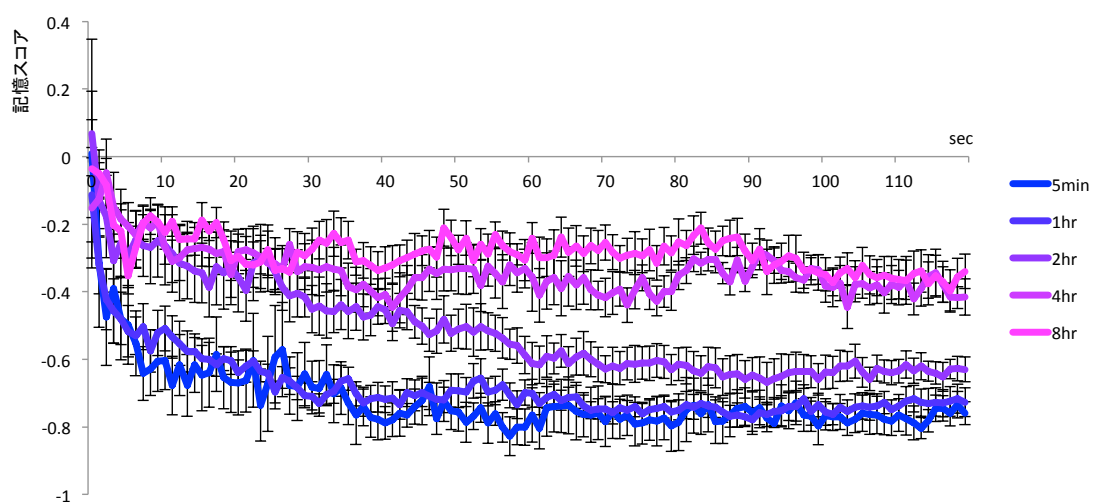


図 1-6 自動実験装置を用いて測定した野生型ショウジョウバエの嗅覚罰記憶。

横軸：テスト開始後からの時間（秒）。

縦軸：記憶スコア。平均±標準誤差。

各群 n=8。

長期報酬記憶の読み出しは短期報酬記憶に比べて遅い

砂糖を報酬として用いた嗅覚報酬学習は、一回の学習で短期記憶と長期記憶の両方を形成する (Krashes and Waddell, 2008)。上記の嗅覚記憶テスト装置を用いて、砂糖報酬学習後5分と24時間の記憶の記憶読み出し行動を比較した (図1-7)。記憶テスト開始から300秒間を解析の対象とした。記憶スコアの時間推移は、双曲線 ($y=ax/(x+b)$) を用いて近似できる (短期記憶: $R^2=0.9867$ 、長期記憶: $R^2=0.9844$)。この近似曲線を用い、それぞれの記憶スコアが仮想最大値の1/2に達するまでの時間 (半減期) を計算することができる。この半減期は記憶スコアの絶対値に関わらず、その読み出し速度の評価とみなすことができる。これを計算したところ、短期記憶では19.56秒だったが長期記憶では28.30秒だった。短期記憶と長期記憶の間で統計的な比較を行うため、各実験群のデータ (短期記憶: $n=48$ 、長期記憶: $n=36$) を個別に解析し、それぞれ同様に半減期を計算した (図1-8)。その結果、統計的に有意に ($P=0.023$, Man-Whitney U-test)、長期記憶の読み出しに時間がかかることが明らかになった。

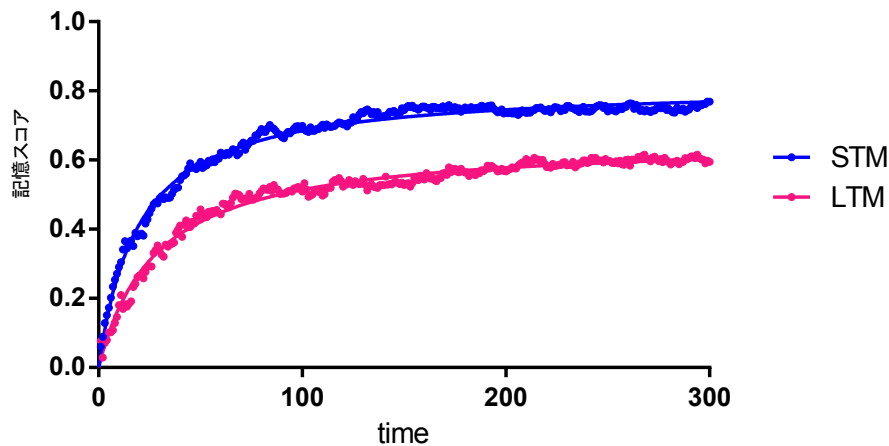


図 1-7 短期報酬記憶と長期報酬記憶の読み出し行動

STM : 5 分記憶、 $n=48$

LTM : 24 時間記憶、 $n=36$

ドットは各グループの記憶スコアの平均値、曲線はその双曲線近似。

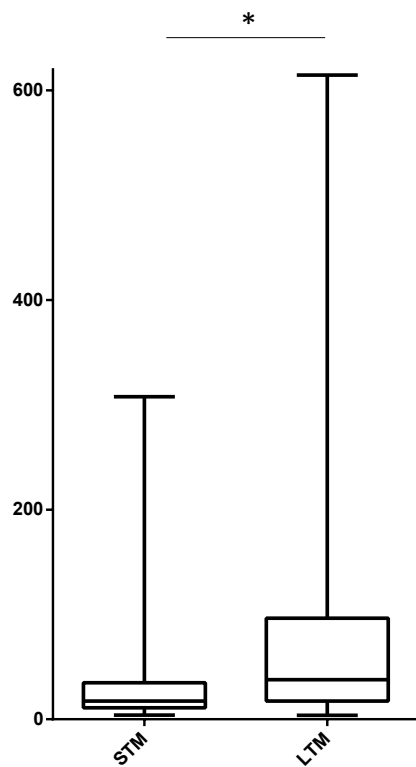


図 1-8 短期報酬記憶と長期報酬記憶の読み出し半減期

各実験群の読み出し半減期（秒）を計算し、グラフ化した。髭：最大値と最小値。箱の上限と下限：75%値と25%値。箱の内部線は中央値。*: $P < 0.05$ 。

近似精度が極度に悪いデータ ($R^2 < 0.054$, 全体の5%) は排除した。

第2部：罰・報酬学習に必要なキノコ体出力神経の網羅的探索

嗅覚罰記憶、嗅覚報酬記憶はどちらもキノコ体において形成され、読み出される（序論）。ここではこれらの相反する記憶が、キノコ体内の同じ領域から出力されるのか（図2-1、上段）、それとも異なる領域から出力されるのか（図2-1、下段）を検証することを目的とした。

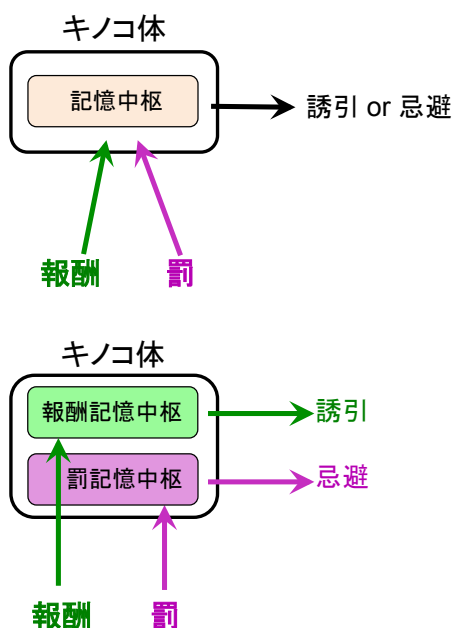


図 2-1 嗅覚罰記憶と嗅覚報酬記憶の読み出し回路

上段：同一のキノコ体出力回路によって誘引あるいは忌避行動が引き起こされるモデル。

下段：異なる出力回路によって誘引あるいは忌避が引き起こされるモデル。

先行研究により、報酬情報（図2-1、緑）と罰情報（図2-1、マゼンタ）は異なるドーパミン神経細胞種によって伝達されることが知られている（Aso et al., 2012; Aso et al., 2010; Burke et al., 2012; Claridge-Chang et al., 2009; Liu et al., 2012; Schwaerzel et al., 2003）。報酬情報を伝達するドーパミン神経細胞種と罰情報を伝達するドーパミン神経細胞種は、キノコ体内の異なる領域に投射する。異なる領域で形成された報酬記憶と罰記憶は、それぞれどの神経により出力されるのであろうか。これを解明するため、キノコ体から出力する神経細胞種を機能阻害し、罰・報酬記憶を測定した。

split GAL4を用いた細胞種特異的な神経伝達阻害

細胞種特異的な神経伝達阻害には、Shibire^{ts} (Shi^{ts})が有効である。Shi^{ts}は、ダイナミンの温度感受性ドミナントネガティブ変異で、高温時 (>30℃) 特異的にエンドサイトーシスを阻害することで神経伝達を阻害する (Kitamoto, 2001)。

Shi^{ts}を各出力神経細胞種に発現させるため、GAL4/UASシステムを用いた。この系では、細胞種特異的に活性化するプロモーターに酵母の転写因子GAL4をつなぐことで、その細胞種において任意の遺伝子を発現させることができる (序論)。しかし、キノコ体出力神経細胞は、ほとんどの細胞種について非常に数が少なく (脳片半球あたり1~2個) (Aso et al.,

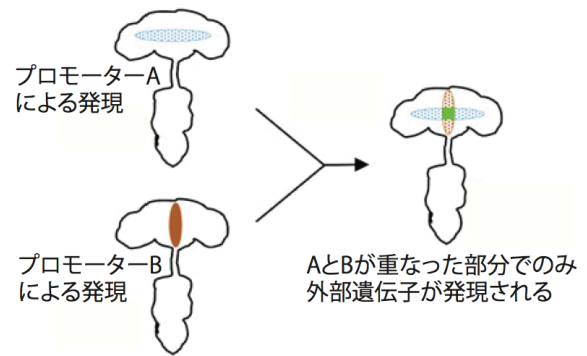


図 2-2 split Gal4 法
Luan et al., 2006 より改変。

2014)、従来の方法では発現パターンの特異性に問題があった。そこで本研究では、G. Rubin博士らのグループ (Janelia Research Campus) と共同で、split GAL4法という新たな手法を用いた (Luan et al., 2006)。split GAL4法では、二つの異なるプロモーターを用い、その発現が重なった細胞でのみGAL4活性を得る (図2-2)。このためsplit GAL4法を用いることで、従来の方法では得ることが難しい、高い細胞特異性のGAL4システムを作製できる。私が所属した谷本拓研究室はRubin博士らのグループと共同で、既知の約7000のプロモーター (Jenett et al., 2012)の組み合わせにより約250系統のsplit GAL4システムライブラリを作製した (Aso et al., 2014)。このsplit Gal4システムライブラリはキノコ体に投射する神経細胞種について、知られているほぼ全ての神経細胞種を網羅している。さらにその発現特異性は非常に高く、多くの出力神経細胞種について単一細胞種レベルの操作が可能である (図2-3)。

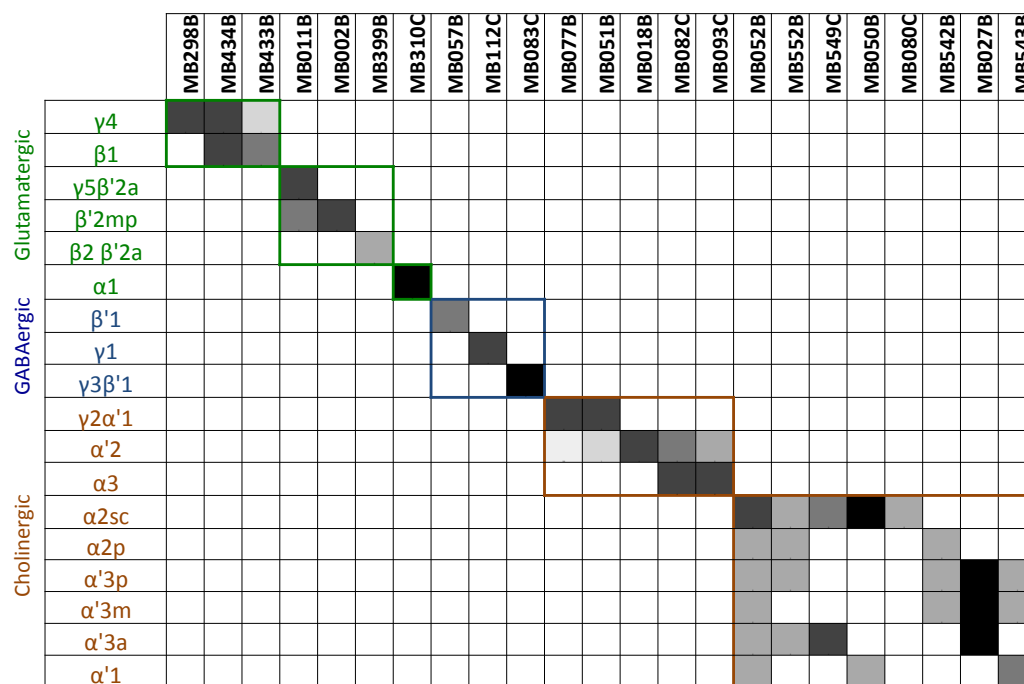


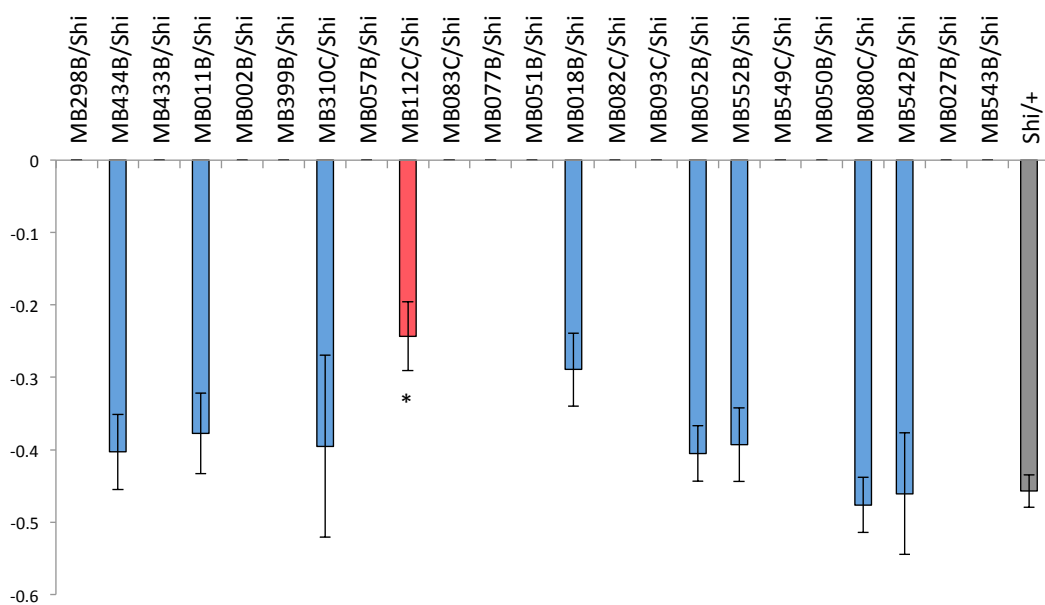
図 2-3 *split GAL4* によって出力神経を特異的に操作できる
横軸に今回用いられた *split GAL4* 系統 (MBxxx)、縦軸に細胞種 (γ4, β1...) を並べた。細胞種は、キノコ体内における投射領域で示されている。緑で示した細胞種はグルタミン酸作動性、青は GABA 作動性、茶はアセチルコリン作動性の神経細胞種である。それぞれの色で囲われた細胞種は同一の細胞クラスターに属する。黒の濃淡は発現レベルの強さを表す。Aso et al., 2014a より改変。

嗅覚罰記憶に必要なキノコ体出力神経細胞種

嗅覚罰記憶に必要なキノコ体出力神経細胞種を同定するため、上記の合計23の *split GAL4* 系統と、*UAS-Shi^{ts}* 系統を掛け合わせるにより個々の出力神経細胞種で *Shi^{ts}* を発現させた個体を作製した。これらの個体に対し電気ショックと匂いの連合学習を行い、二時間後の記憶を測定した (図0-1、下段)。この際に学習から記憶テストまでの全ての作業を高温下 (32°C) で行い、*Shi^{ts}* による神経阻害を行った。

一次スクリーニングとして、最近作製された *UAS-Shi^{ts}* 系統 (*pJFRC100-20X UAS-Shibire^{ts1}, in VK00005*) (Pfeiffer et al., 2012) を用いたところ、複数の系統について有意な記憶障害が見られた。ところが、記憶障害が見られた系統に

ついて低温下（24℃）で同様な実験を行ったところ、この条件下でも記憶障害を示す系統が散見された。これは *Shi^{ts}* の発現レベルが高すぎたため、低温下でも標的細胞種が阻害されているか、あるいは、発生段階で細胞死が起きている、などの可能性が考えられる。この問題を解決するため、*Shi^{ts}* の発現レベルが上記のものより低い *UAS-shi* 系統（*UAS-shibire^{ts} x1*）を用いた。上記の一次スクリーニングで記憶障害を示した図 2-4 に記載の 9 つの *split GAL4* 系統について、*UAS-shibire^{ts1} x1* と掛け合わせ、同様に高温下で二時間嗅覚罰記憶を測定した。その結果、*MB112C-GAL4* について、対照群（*UAS-shibire^{ts} x1* のみの個体群、図 2-4 右端）とは有意に異なる記憶障害を観測した（図 2-4）。*MB112C-GAL4* は出力神経細胞 MBON- γ 1pedc> α/β に特異的な発現を示す（図 2-6 左）。MBON- γ 1pedc> α/β は、 γ 葉の付け根にあたる γ 1 領域と α/β ケニオン細胞の peduncle 領域から出力する GABA 作動性の出力神経である（図 0-2、図 2-7）（Aso et al., 2014）。低温下で学習、記憶テストを行ったところ、*MB112C-GAL4/UAS-shi^{ts}* は記憶障害を示さなかった（図 2-5 B）。また、高温下（32℃）でも電気ショックからの逃避行動（図 2-5 C）、匂いからの逃避行動に異常は見られなかった（図 2-5 D, E）。以上の結果は、MBON- γ 1pedc> α/β が匂いや電気ショックの受容ではなく記憶学習行動に必要であることを示唆している。



(前ページ) 図 2-4 split GAL4 系統による神経障害の二時間嗅覚罰記憶に対する効果

学習から記憶テストまで 32°Cで行った。右端は *UAS-shi* のみが挿入されたコントロール。*MB112C/UAS-shi* はコントロールと比較して有意に異なる記憶スコアを示した ($P < 0.05$)。空欄は一次スクリーニングで記憶障害を示さなかった系統 (本文参照)。棒グラフは平均±標準誤差。 $n \geq 7$ 。

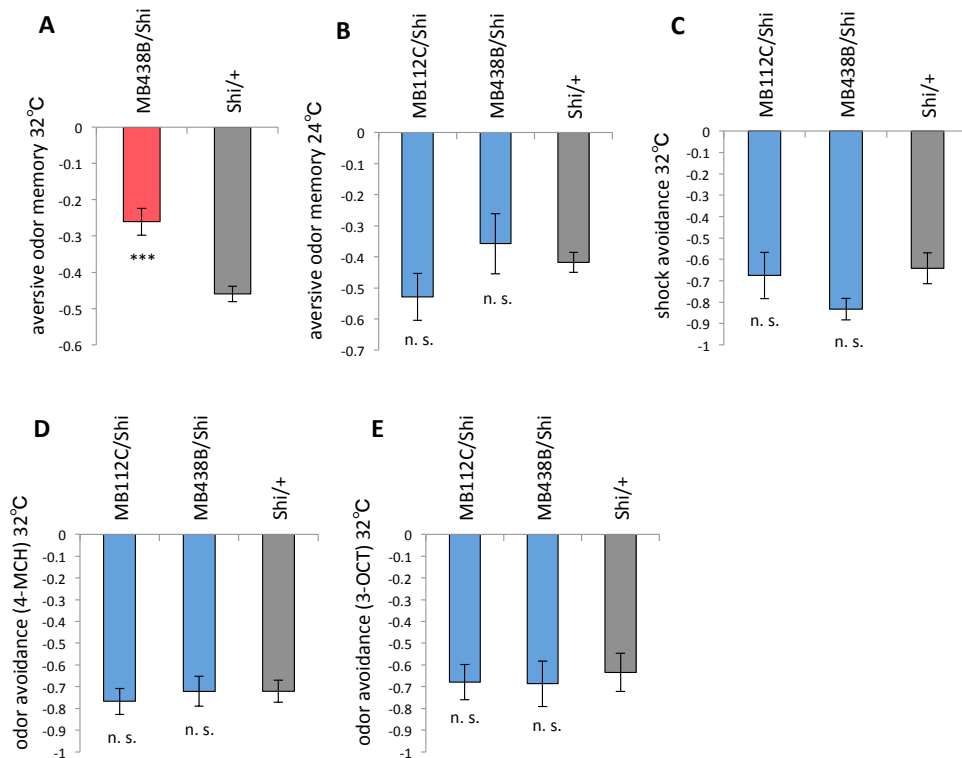


図 2-5 MBON-γ1pedc>α/βおよび PPL1-γ1pedc>α/βは嗅覚罰記憶に必要である。

(A) 32°C で匂い電気ショック学習・テストを行った際の二時間記憶。

MB438B/UAS-Shi は *UAS-shi^{ts}/+* に比べて有意に低い記憶スコアを示した ($P < 0.001$)。

(B) 24°C で匂い電気ショック学習・テストを行った際の二時間記憶。

(C) 32°C における電気ショック忌避スコア。計算式は記憶スコアと同様。

(D), (E) 32°C における匂い忌避スコア。記憶テストに用いた T 迷路で 3-octanol (3-OCT) (D)、4-methylcyclohexanol (4-MCH) (E)からの忌避行動を定量した。3-OCT と 4-MCH は、記憶学習スクリーニングに用いられた匂いである。

棒グラフは平均±標準誤差。***: $P < 0.001$, n.s.: $P > 0.05$. $n \geq 7$ 。

γ1 領域とα/βケニオン細胞の peduncle 領域には、特定のドーパミン作動性神経細胞 (PPL1-γ1pedc>α/β) が軸索終末を投射する。PPL1-γ1pedc>α/βも

MBON- $\gamma 1$ pedc> α/β と同様に二時間嗅覚罰記憶に必要であるか調べるため、別の *split GAL4* 系統 (*MB438B-GAL4*) を用いて *Shits* を発現させ、神経障害実験を行った (図 2-6、右)。その結果 MBON- $\gamma 1$ pedc> α/β の場合と同様に、高温下で二時間嗅覚罰記憶が有意に低下した (図 2-5 A)。低温下での記憶スコアは正常であり (図 2-5 B)、高温下での電気ショック逃避、匂い逃避行動に影響は見られなかった (図 2-5 C-E)。以上の結果から PPL1- $\gamma 1$ pedc> α/β も、嗅覚罰記憶に必要であることが示された。これは、細胞種特異性の低い GAL4 系統を使った以前の研究 (Aso et al., 2012) ととも一致している。

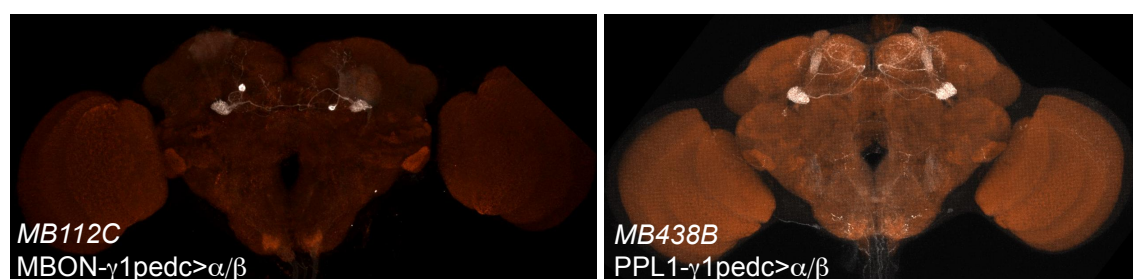
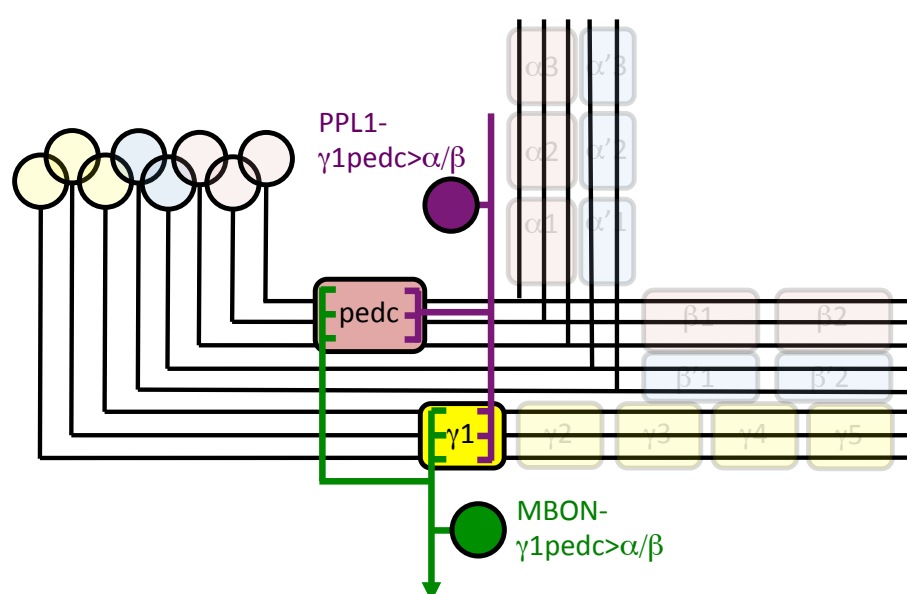


図 2-6 神経伝達障害により有意な記憶障害を示した *split GAL4* 系統 *MB112C-GAL4* (左) と *MB438B-GAL4* (右) によって発現誘導された細胞膜タグ染色。Aso et al., 2014a より改変。



(前ページ) 図 2-7 嗅覚罰記憶を司る神経回路
キノコ体 γ 葉の $\gamma 1$ 領域と α/β ケニオン細胞のpeduncle領域に入力する
PPL1- $\gamma 1$ pedc> α/β と、同領域から出力する MBON- $\gamma 1$ pedc> α/β が必要である。

嗅覚報酬記憶に必要なキノコ体出力神経細胞種

ここでは、嗅覚報酬記憶に必要なキノコ体出力神経細胞種を同定することを目的とした。前述の嗅覚罰記憶と同様、23の*split GAL4*系統と、*UAS-Shi^{ts}*系統を掛け合わせ、スクロースと匂いを連合させ二時間嗅覚報酬記憶を高温下で測定した(図0-1、上段)。

一次スクリーニングとして上記と同様に、*pJFRC100-20XUAS-Shibire^{ts1}*系統を用いた。一次スクリーニングで記憶障害が見られた13の*split GAL4*系統を対象に、発現レベルが比較的低い*UAS-shibire^{ts1} x1*系統と掛け合わせ、高温下で二時間嗅覚報酬記憶実験を行った。その結果、8系統(*MB011B-GAL4*, *MB310C-GAL4*, *MB077B-GAL4*, *MB051B-GAL4*, *MB018B-GAL4*, *MB082C-GAL4*, *MB093C-GAL4*, *MB050B-GAL4*)について、対照群

(*UAS-Shi^{ts}/+*) と比べて有意に記憶スコアが低下した(図2-8)。この8系統は低温下では正常な記憶スコアを示し、高温下での砂糖への誘引行動にも異常は見られなかった(図2-9)。またこの8系統は高温下での電気ショック匂い学習には異常が見られなかったことから(図2-4)、匂い受容は正常であると考えられる。

*MB011B-GAL4*はM4/M6と呼ばれるグルタミン酸作動性の神経細胞クラスターのMBON- $\gamma 5\beta'2a$, MBON- $\beta'2mp$ を標識する。これらの出力神経細胞の全てまたは一部が二時間砂糖報酬学習に必要なものと考えられる(図2-10)。*MB310C-GAL4*はグルタミン酸作動性のMBON- $\alpha 1$ を標識する(図2-10)。*MB077B-GAL4*, *MB051B-GAL4*, *MB082C-GAL4*, *MB093C-GAL4*はV3/V4クラスターと呼ばれるアセチルコリン作動性の出力神経細胞群(MBON- $\gamma 2\alpha'1$, MBON- $\alpha'2$, MBON- $\alpha 3$)を標識する(図2-10)。MBON- $\alpha 3$ を特異的に標識する系統は測定されなかったため、MBON- $\alpha 3$ は機能不明とした。*MB050B-GAL4*

はV2クラスターと呼ばれるアセチルコリン作動性の出力神経細胞種を標識する。しかし、このクラスターを標識する別のsplit GAL4系統である*MB052B-GAL4*を使った場合には有意な記憶障害は見られなかったため（図2-8）、ここでは機能不明とした。

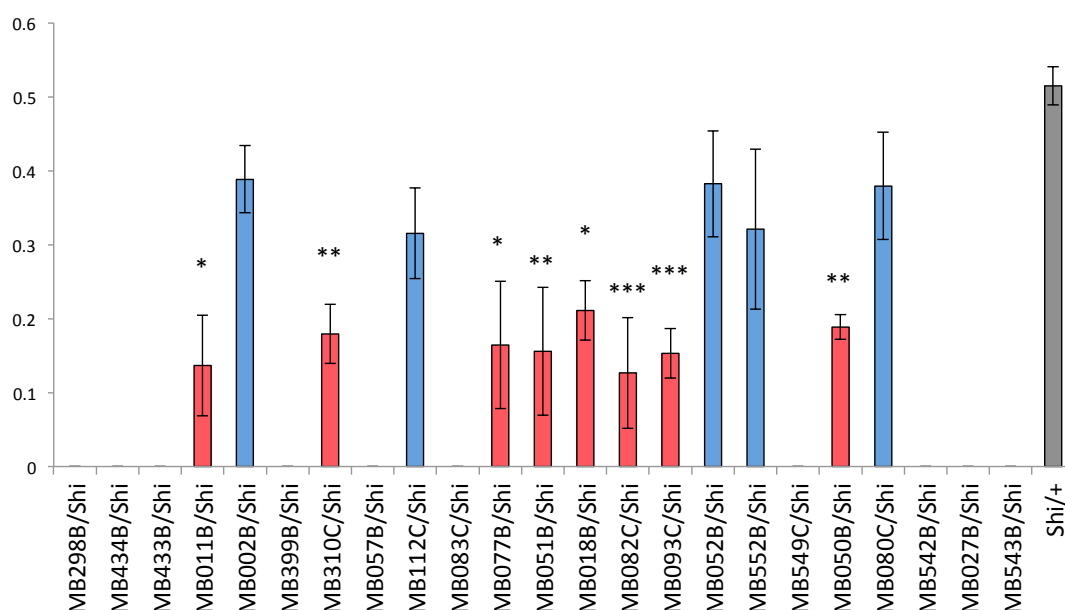


図 2-8 *split GAL4* 系統による神経障害の二時間嗅覚報酬記憶に対する効果
学習から記憶テストまで 32°Cで行った。右端は *UAS-Shi^{ts}* のみが挿入された対照群。
棒グラフは平均±標準誤差。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$. $n \geq 7$.

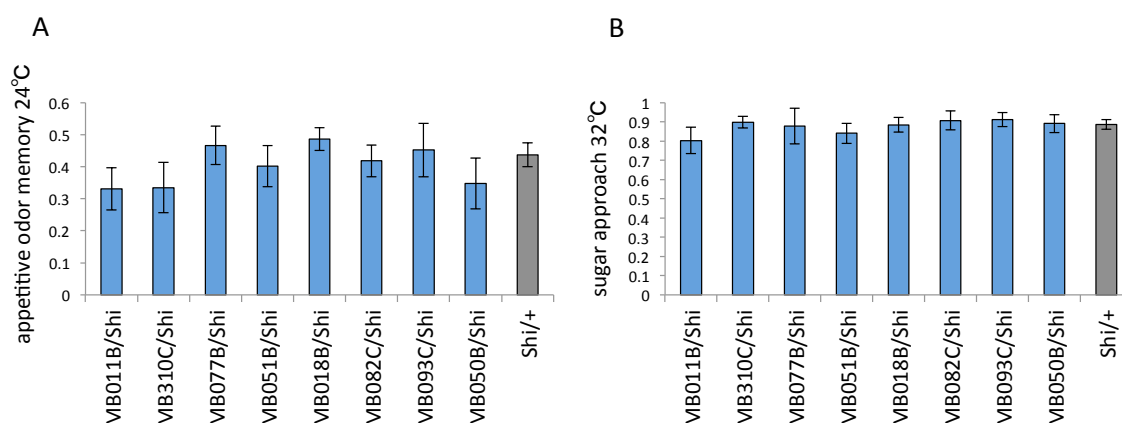


図 2-9 嗅覚報酬記憶の対照実験

(A) 24°C で学習・記憶テストを行った際の二時間記憶。

(B) 32°C における砂糖誘引スコア。計算式は記憶スコアと同様。

棒グラフは平均±標準誤差。全ての実験群で、対照群と有意な差が見られなかった ($P < 0.05$)。

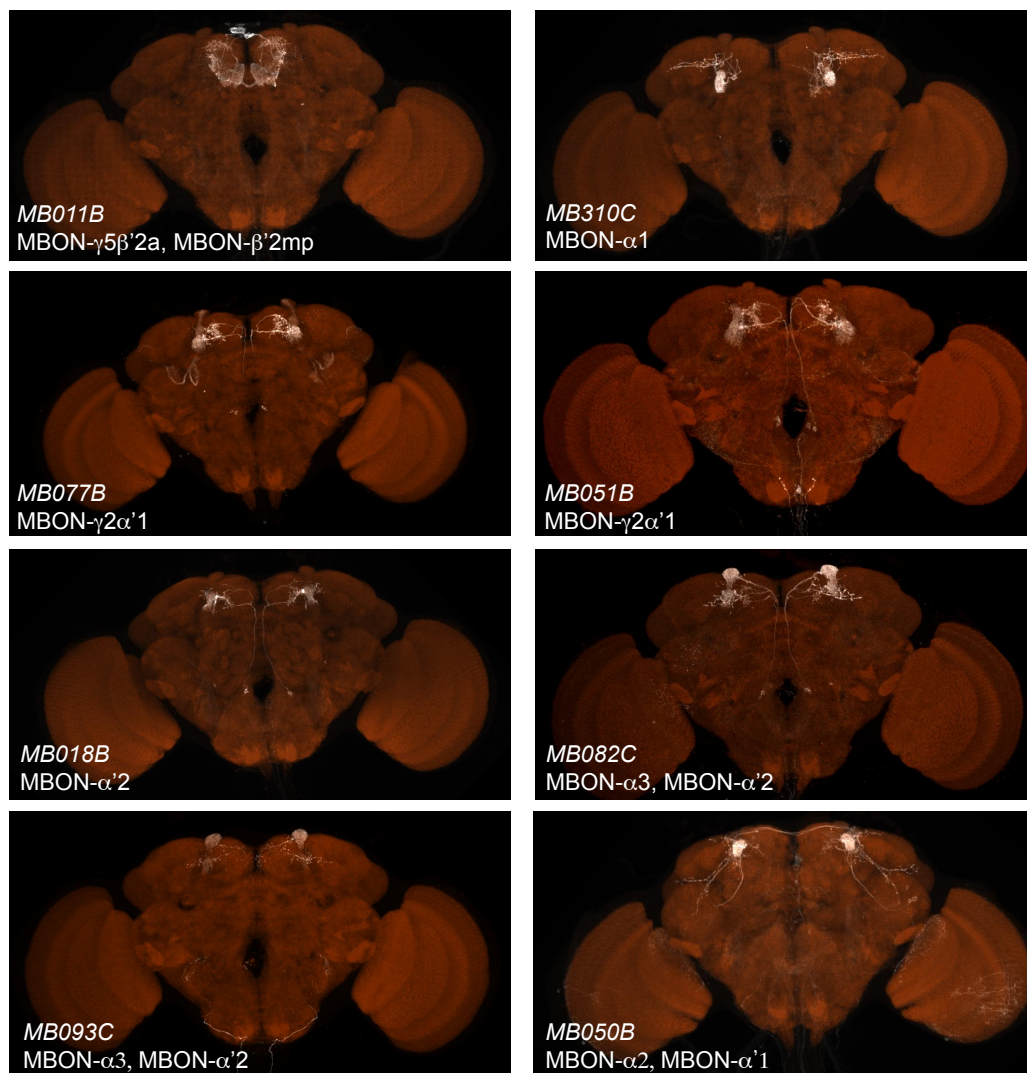


図 2-10 神経伝達阻害により有意な記憶障害を示した *split-GAL4* 系統
各 *split-GAL4* 系統によって発現誘導された細胞膜タグ染色。Aso et al.,
2014a より改変。

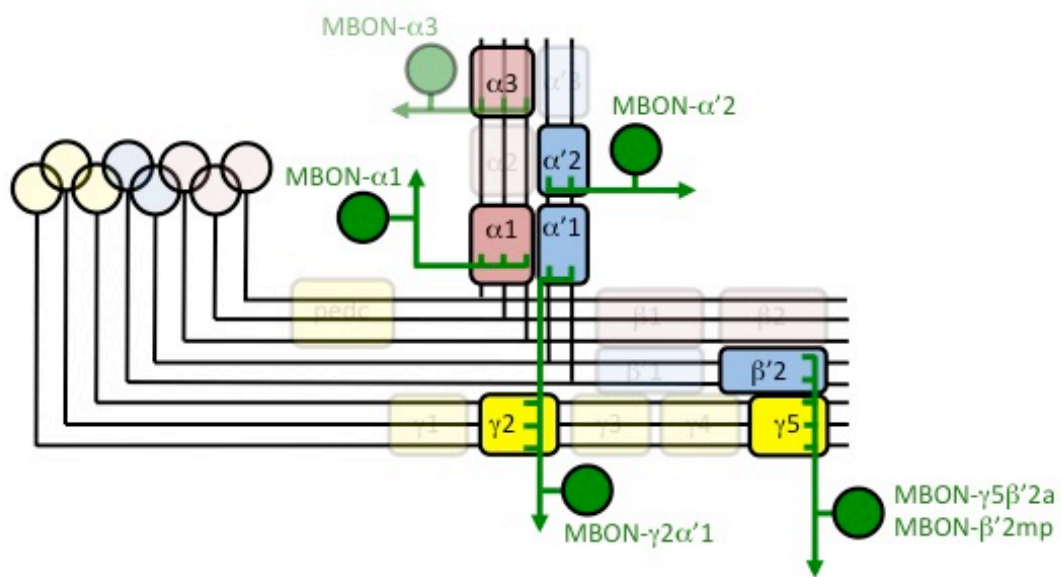


図 2-11 嗅覚報酬記憶を司る神経回路

MBON- $\gamma 5\beta'2a$ 、MBON- $\beta'2mp$ 、MBON- $\alpha 1$ 、MBON- $\gamma 2\alpha'1$ 、MBON- $\alpha'2$ が必要である。

第 3 部：フィードバック報酬回路を介した長期報酬記憶形成機構

報酬情報はどのドーパミン細胞種によって伝達されるのか

キノコ体には、PAM, PPL1, PPL2ab という三つのドーパミン作動性神経クラスターが投射する。このうち PAM クラスターは、報酬情報の伝達に特に重要である。PAM クラスターからの神経伝達が砂糖報酬を用いた嗅覚報酬記憶の形成に必要であること、PAM クラスターの強制発火により砂糖報酬無しで嗅覚報酬記憶を形成すること、多くの PAM クラスター細胞が砂糖報酬に応答することが報告されている (Liu et al., 2012)。しかし PAM クラスターには投射領域の異なる 14 種類の細胞種が含まれ (Aso et al., 2014)、どの細胞種からのドーパミン放出が報酬学習に重要であるかは不明であった。そこで本章ではまず、PAM クラスター内で異なる発現パターンをもつ *split GAL4* 系統群と *UAS-Shits* 系統を掛け合わせ、嗅覚報酬学習への必要性を検討した。

キノコ体 $\alpha 1$ 領域に投射するドーパミン作動性神経が二時間嗅覚報酬記憶の形成に必要である

二時間嗅覚報酬記憶に必要な PAM クラスター細胞を同定するため、18 の *split GAL4* 系統を用いて神経伝達阻害を行った。高温下で匂いと砂糖の連合学習、記憶テストを行ったところ、約半分にあたる 10 系統で対照群と有意に異なる記憶阻害を観察した (図 3-1)。用いられた *split GAL4* 系統の発現パターンを図 3-2 に示す。興味深いことに、記憶阻害効果が大きい 5 系統で共通して標識される細胞種が見つかった。これは、脳片半球あたり 6-8 細胞の、キノコ体 α 葉の $\alpha 1$ 領域に投射する細胞種 (PAM- $\alpha 1$) である。従って PAM- $\alpha 1$ の二時間嗅覚報酬記憶への関与が示唆される。PAM- $\alpha 1$ の学習時の機能を調べるため、学習時のみ高温下で神経伝達阻害を行った。発現ドライバーとして、PAM- $\alpha 1$ に強い発現を示す *split GAL4* 系統、*MB299B-GAL4* を用いた (図 3-3)。その結果、同様の記憶障害が観察され、PAM- $\alpha 1$ の記憶形成への重要性が示唆された。

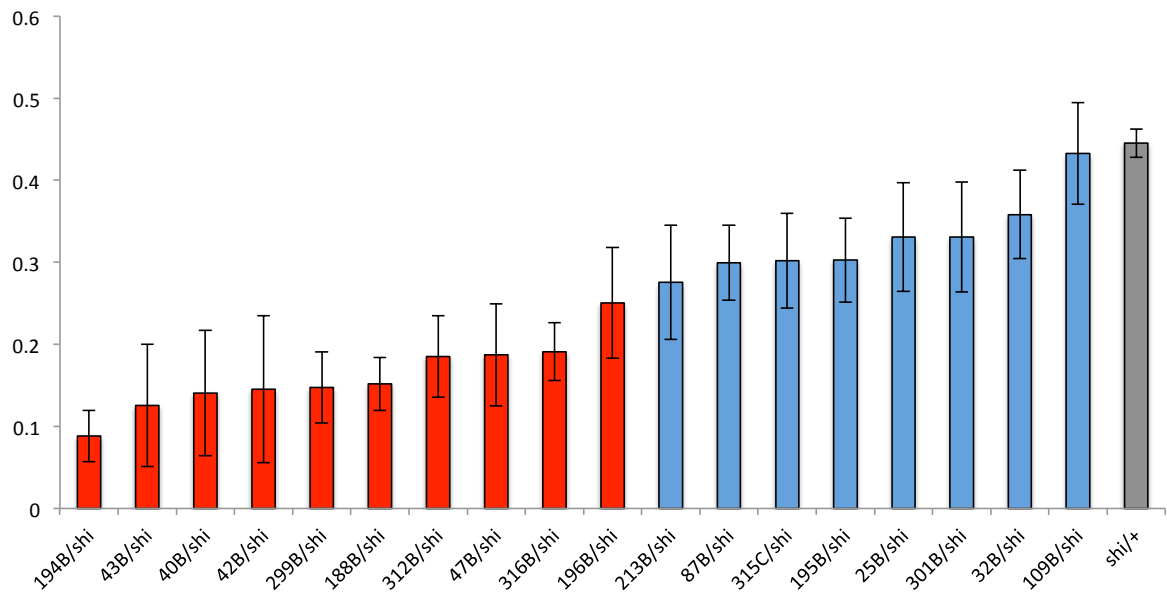
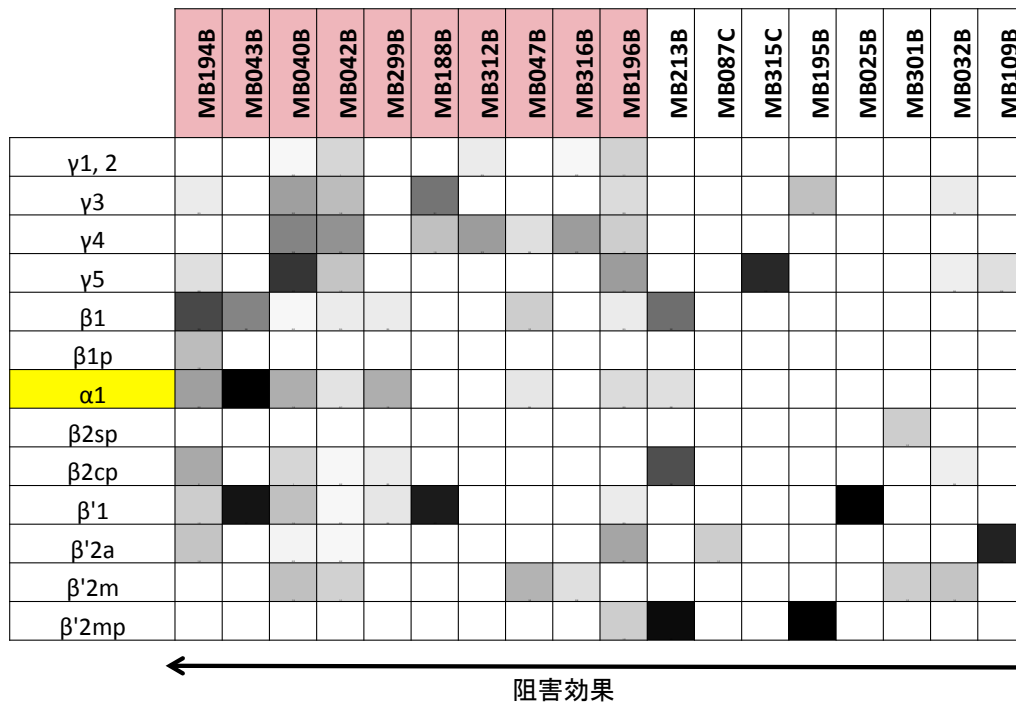


図 3-1 PAM 細胞種に発現をもつ *split GAL4* 系統を用いた神経伝達阻害実験
 学習から記憶テストまで 32℃で行った。右端は *UAS-Shi^{ts}* のみが挿入された対照群。
 左から順に阻害効果の大きい系統を並べた。
 赤で示された系統について、対照群から有意に異なる ($P < 0.05$) 記憶スコアを示した。
 棒グラフは平均±標準誤差。 $n \geq 7$ 。



(前ページ) 図 3-2 用いられた *split GAL4* 系統によって標識される PAM クラスター細胞

図 3-1 の結果から、左から順に記憶障害効果の大きい系統を並べた。左の列は各 PAM 細胞種のキノコ体内での投射領域を示す。赤く塗られた系統で有意な記憶障害を観察した ($P < 0.05$)。障害効果の最も大きい 5 系統で、 $\alpha 1$ 領域 (黄色) に投射する細胞での発現が見られた。

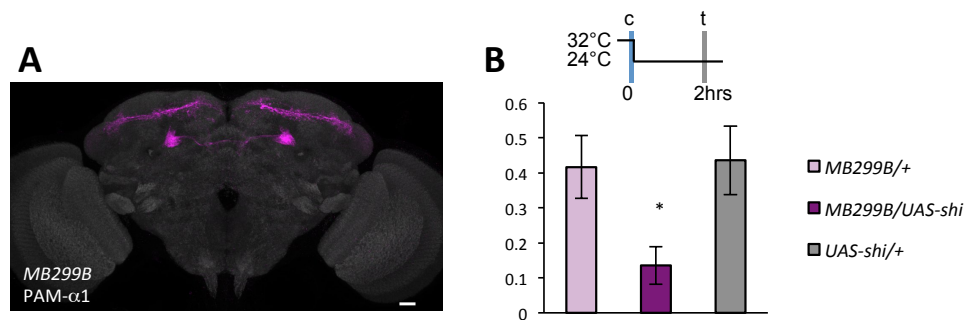


図 3-3 PAM- $\alpha 1$ は二時間嗅覚報酬記憶の形成に必要である

(A) *MB299B-GAL4* の発現パターン

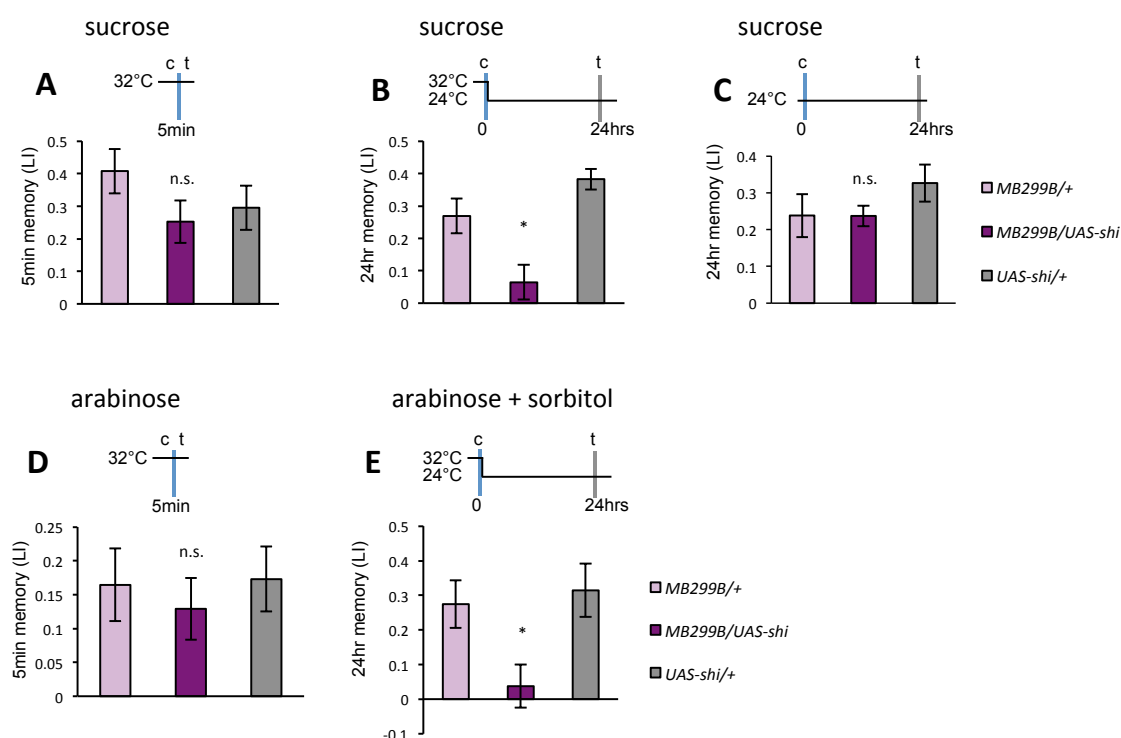
(B) 学習時に PAM- $\alpha 1$ を障害することで二時間報酬記憶に有意な障害が見られた ($P < 0.05$)。棒グラフは平均 \pm 標準誤差。 $n = 6-9$ 。

PAM- $\alpha 1$ は栄養摂取依存的な長期記憶形成に必要である

PAM- $\alpha 1$ の機能をさらに詳細に調べるため、PAM- $\alpha 1$ からの神経伝達を障害して短期記憶 (5 分記憶)、長期記憶 (24 時間記憶) を測定した。スクロースと匂いを用いた嗅覚報酬学習は、一回の学習でタンパク質合成依存的な長期記憶を形成する (Krashes and Waddell, 2008)。興味深いことに、PAM- $\alpha 1$ からの神経伝達を障害しても短期記憶には記憶障害は見られなかった (図 3-4 A)。一方、長期記憶には強い記憶障害を引き起こした (図 3-4 B)。低温下で学習、記憶テストを行った場合、記憶障害は観察されなかった (図 3-4 C)。短期記憶が正常であったことから、PAM- $\alpha 1$ は砂糖や匂いの受容には関与しないと考えられる。以上の結果より、PAM- $\alpha 1$ は短期記憶には必要でないが、長期記憶の形成に必要であることが示された。

先行研究により、長期報酬記憶の形成には栄養の摂取が必要であることが報告されている。アラビノースと匂いの連合学習では短期記憶のみが形成され、

長期記憶は形成されない。一方、甘味はないが栄養のあるソルビトールをアラビノースと混ぜて匂いとともに提示した場合は、短期記憶と長期記憶の両方が形成される (Burke and Waddell, 2011; Cervantes-Sandoval and Davis, 2012)。PAM- α 1 からの神経伝達障害がスクロースの短期記憶には影響せず長期記憶の形成を阻害したことから (図 3-4 A, B)、PAM- α 1 は栄養を摂取したという情報の伝達に関与する可能性が考えられる。実際、アラビノースを匂いとともに提示した場合の短期記憶は PAM- α 1 を必要としないが (図 3-4 D)、アラビノースにソルビトールを混ぜて提示した場合の長期記憶の形成には必要であるということが明らかになった (図 3-4 E)。従って、PAM- α 1 は栄養摂取情報をキノコ体に伝達することで長期記憶形成を誘導していると考えられる。



- (前ページ) 図 3-4 PAM- $\alpha 1$ は栄養摂取依存的な長期記憶形成に必要である
- (A) 匂いとスクロースを用いた 5 分記憶は PAM- $\alpha 1$ を必要としない。 $n = 10-12$ 。
 - (B) 匂いとスクロースを用いた 24 時間記憶の学習には PAM- $\alpha 1$ が必要である。 $n = 9-12$
 - (C) 低温下では長期記憶障害は見られない。 $n = 6-11$ 。
 - (D) アラビノースを用いた 5 分記憶は PAM- $\alpha 1$ を必要としない。 $n = 12-14$ 。
 - (E) アラビノースにソルビトールを加えて与えた 24 時間記憶の学習には PAM- $\alpha 1$ が必要である。 $n = 13-15$ 。
- 棒グラフは平均 \pm 標準誤差。*: $P < 0.05$, n.s: $P > 0.05$ 。c: 学習 (conditioning)、t: 記憶テスト (test)。

MBON- $\alpha 1$ は PAM- $\alpha 1$ の樹状突起領域に軸索終末を投射する

次に PAM- $\alpha 1$ の上流でこの神経を制御する神経を探索した。PAM- $\alpha 1$ は軸索終末をキノコ体の $\alpha 1$ 領域に、樹状突起を SMP, SIP, SLP (それぞれ superior medial protocerebra, superior intermediate protocerebra, superior lateral protocerebra) 領域に投射する (図 3-5 A, B) (Aso et al., 2014; Liu et al., 2012)。驚くべきことに、キノコ体の $\alpha 1$ 領域から出力する MBON- $\alpha 1$ も SIP, SLP 領域に投射することが見つかった (図 3-5 C, D)。MBON- $\alpha 1$ は PAM- $\alpha 1$ とは逆にキノコ体 $\alpha 1$ 領域から SIP, SLP 領域に軸索終末を投射する (Aso et al., 2014)。従って、MBON- $\alpha 1$ と PAM- $\alpha 1$ はフィードバック回路を形成する可能性がある (図 3-5 E, F)。

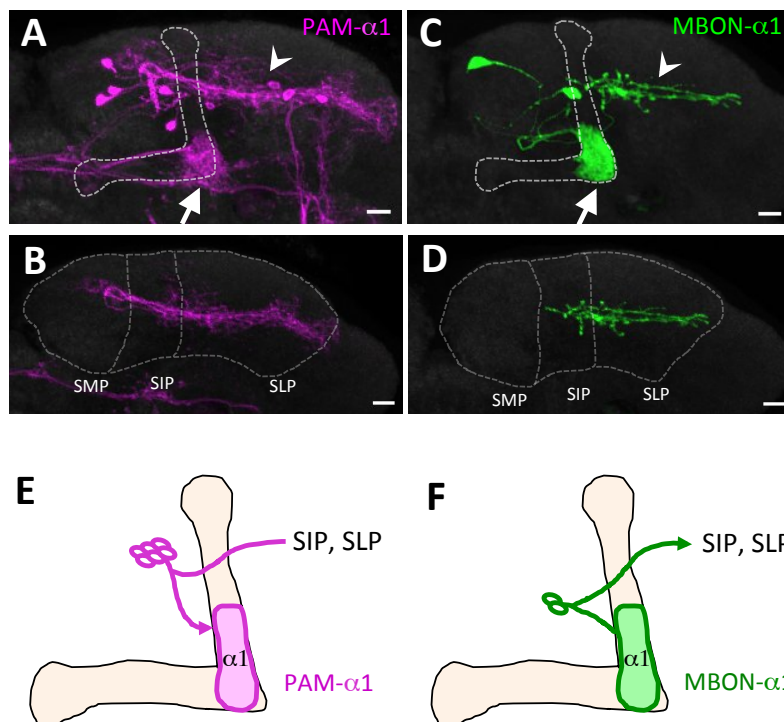


図 3-5 MBON- $\alpha 1$ は PAM- $\alpha 1$ と同様な領域に逆の極性で投射する
 (A-D) PAM- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 1$ の形態。点線はキノコ体の α/β 葉 (A, C)、および SMP, SIP, SLP 領域 (B, D)。矢印はキノコ体領域、矢頭は SIP, SLP 領域を指す。Janelia Research Campus の麻生博士からの提供。
 (E, F) 模式図。PAM- $\alpha 1$ は SIP, SLP 領域からキノコ体 $\alpha 1$ 領域に投射する。MBON- $\alpha 1$ は逆に、キノコ体 $\alpha 1$ 領域から SIP, SLP 領域に投射する。
 スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。

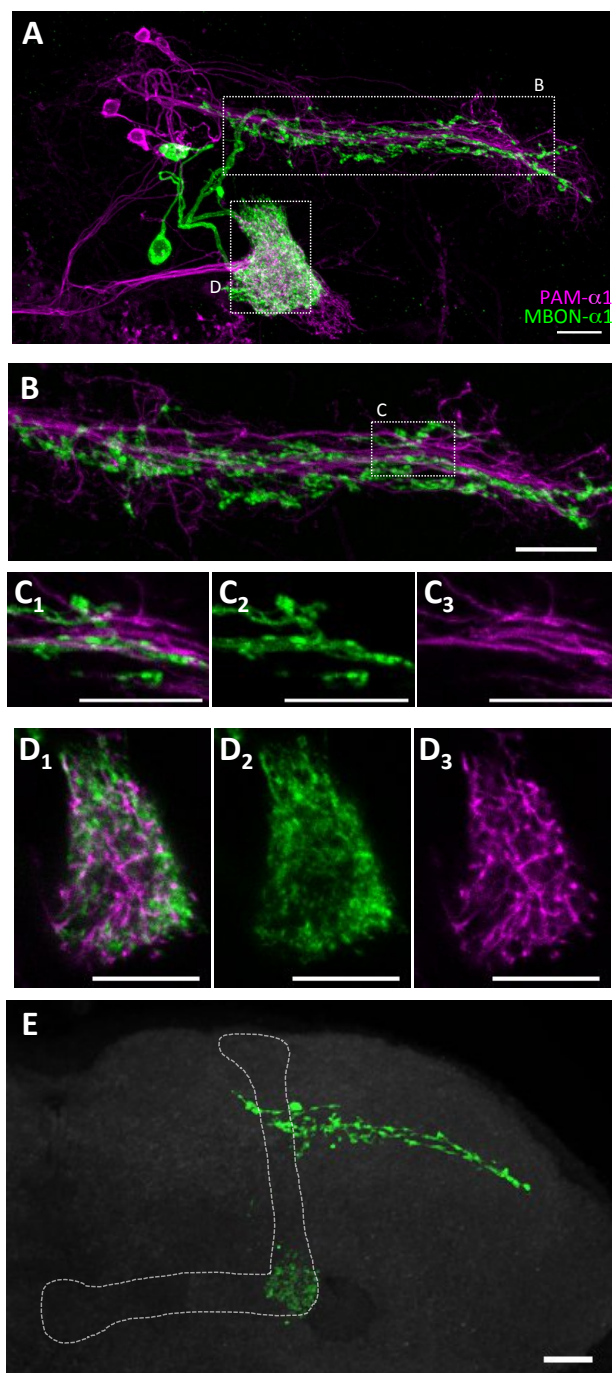


図 3-6 MBON- $\alpha 1$ と PAM- $\alpha 1$ はキノコ体 $\alpha 1$ 領域と SIP, SLP 領域で近接する
 (A-D) PAM- $\alpha 1$ (*72D01-LexA*)と MBON- $\alpha 1$ (*MB310C-GAL4*)の二重染色。緑が MBON- $\alpha 1$ 、マゼンタが PAM- $\alpha 1$ を示す。SIP, SLP 領域 (B, C)、キノコ体 $\alpha 1$ 領域 (D) の両方で二つの神経が近接する。Janelia Research Campus の麻生博士からの提供。
 (E) PAM- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 1$ の GRASP 画像。SIP, SLP 領域とキノコ体 $\alpha 1$ 領域の両方で強いシグナルが観察される。
 スケールバーは 10 μ m。

次に PAM- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 1$ が互いに近接しているかを確かめた。このため、GAL4/UAS システムとは独立の、大腸菌由来の転写因子 LexA とその結合配列である LexAop を用いた発現誘導システム (Lai et al., 2008; Szuts and Bienz, 2000) を GAL4/UAS システムとともに用い、PAM- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 1$ を異なる蛍光タンパク質で標識した。PAM- $\alpha 1$ を標識する *R72D01-LexA* と MBON- $\alpha 1$ を標識する *MB310C-GAL4* を用いた二重染色により、PAM- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 1$ がキノコ体 $\alpha 1$ 領域と SIP, SLP 領域の両方で、共焦点顕微鏡の解像度以下の距離で近接していることが明らかになった (図 3-6 A-D)。さらに、PAM- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 1$ の間で GRASP (GFP reconstitution across synaptic partner) 実験を行った。GRASP は、二種類の細胞に GFP の異なるドメインを発現させ、細胞が互いに近接する場合 (~100nm) にのみ GFP の蛍光を得る方法である (Feinberg et al., 2008; Gordon and Scott, 2009)。 *R72D01-LexA* と *MB310C-GAL4* を用いて GRASP を行ったところ、キノコ体 $\alpha 1$ 領域と SIP, SLP 領域の両方で強い GFP 蛍光を検出した (図 3-6 E)。以上の結果をまとめると、PAM- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 1$ は互いの樹状突起と軸索終末を互いに近接させ、フィードバック回路を形成していることが強く示唆される。

長期報酬記憶形成には NMDA 受容体を介した MBON- $\alpha 1$ からのフィードバックが必要である

MBON- $\alpha 1$ を介したフィードバック回路が PAM- $\alpha 1$ の活動制御に重要であるならば、MBON- $\alpha 1$ からの神経伝達も PAM- $\alpha 1$ と同様、長期報酬記憶の形成に必要であると考えられる。この可能性を検証するため、MBON- $\alpha 1$ で特異的に GAL4 活性を示す二つの *split GAL4* 系統、*MB310C-GAL4* と *MB323B-GAL4* を用いて機能阻害実験を行った (図 3-7 A-C)。 *MB310C-GAL4*, *MB323B-GAL4* により *Shits* を発現させ、高温下でスクロースを用いた短期記憶を測定したところ PAM- $\alpha 1$ と同様、記憶障害は観察されなかった (図 3-7 D)。一方、長期報酬記憶には強い記憶障害が観察された (図 3-7 E)。低温下で学習、記憶テストを行った場合、記憶障害は見られなかった (図 3-7 F)。以上の結果は PAM- $\alpha 1$ と

MBON- $\alpha 1$ が同一経路で機能する可能性を示唆する。

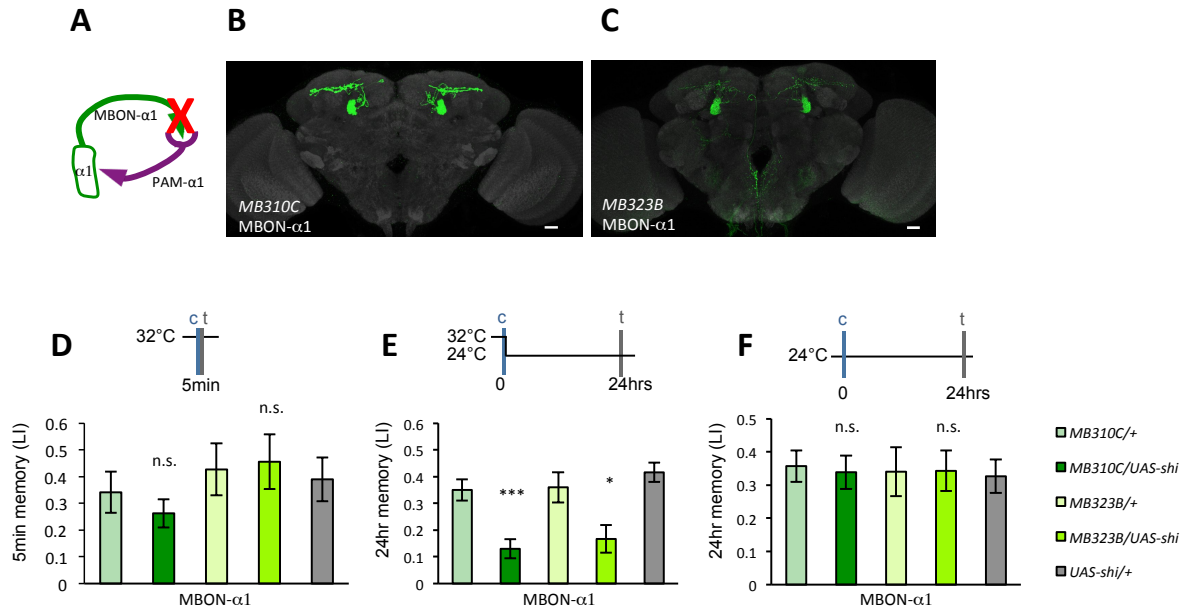


図 3-7 MBON- $\alpha 1$ は長期記憶形成に必要である

(A) MBON- $\alpha 1$ からの神経伝達阻害を行った。

(B, C) MB310C-GAL4, MB323B-GAL4 の発現パターン

(D) MBON- $\alpha 1$ の神経伝達阻害は短期記憶に影響しない。 $n = 6-10$ 。

(E) MBON- $\alpha 1$ の神経伝達阻害を学習時に行うことで長期記憶形成が阻害される。 $n = 13-24$ 。

(F) 学習、テストを低温で行った場合には長期記憶形成は阻害されない。 $n = 8-17$ 。
スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。棒グラフは平均 \pm 標準誤差。*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, n.s.: $P > 0.05$ 。

MBON- $\alpha 1$ はグルタミン酸作動性である (Aso et al., 2014; Aso et al., 2014b)。PAM- $\alpha 1$ がグルタミン酸を受容することが長期記憶形成に重要であるかを検証するため、PAM- $\alpha 1$ においてグルタミン酸受容体のノックダウン実験を行った。受容体のノックダウン効率を上げるため、従来の長いヘアピン RNA よりも効率が良いとされる shRNA (short-hairpin RNA) をコードする UAS 系統を用いた (Ni et al., 2011)。興味深いことに、ショウジョウバエの NMDA 受容体のサブユニットをコードする遺伝子である *dNR-1* と *dNR-2* を PAM- $\alpha 1$ で特異的にノックダウンしたところ (図 3-8 A)、短期記憶は正常であったが長期記憶に強い記憶障害が見られた (図 3-8 B, C)。以上の結果は、MBON- $\alpha 1$ からのグルタ

ミン酸放出による神経伝達が PAM- α 1 の NMDA 受容体によって受容され、報酬情報を増強するという仮説を支持する。

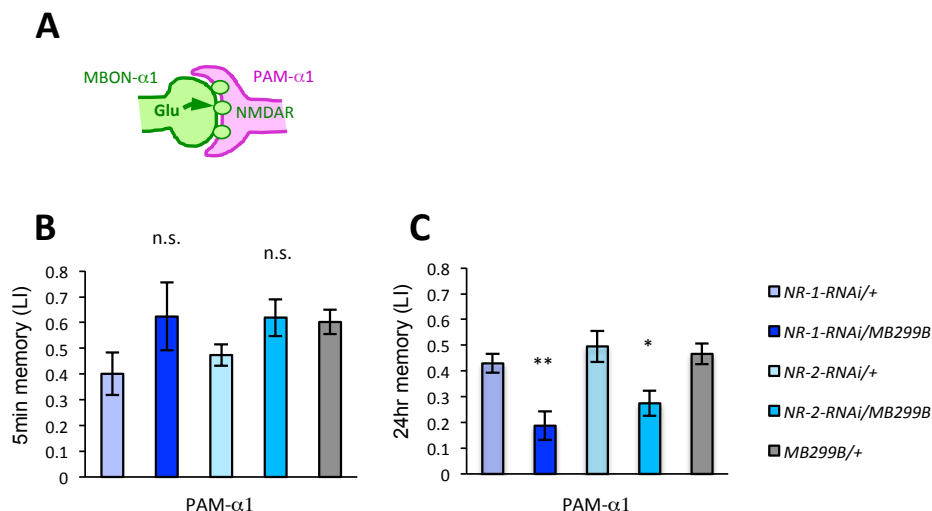


図 3-8 PAM- α 1 は NMDA 受容体を通して報酬情報を受け取る

(A) PAM- α 1 において NMDA 受容体をノックダウンした。

(B) NMDA 受容体ノックダウンは短期記憶には影響しない。 $n = 8-13$ 。

(C) NMDA 受容体ノックダウンにより長期記憶が阻害された。 $n = 8-29$ 。

棒グラフは平均 \pm 標準誤差。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, n.s.: $P > 0.05$ 。

DopR1 を介した記憶は α/β ケニオン細胞で形成される

ショウジョウバエにおいて多くの連合記憶が、興奮性のドーパミン受容体 DopR1 を通してケニオン細胞で形成されることが知られている (Kim et al., 2007; Liu et al., 2012; Qin et al., 2012)。しかし長期報酬記憶については、どの細胞が DopR1 を介してドーパミンを受容するのか不明であった。 α/β ケニオン細胞と MBON- α 1 はどちらも PAM- α 1 の軸索終末と近接し、PAM- α 1 からのドーパミンを受容する可能性がある (図 0-2、図 3-6)。そこで α/β ケニオン細胞と MBON- α 1 においてそれぞれ *DopR1* 遺伝子をノックダウンし、報酬記憶への必要性を検討した。 α/β ケニオン細胞で shRNA を特異的に発現させるため、二つの *GAL4* 系統を用いた: *c739-GAL4* (Aso et al., 2009; Yang et al., 1995) と *MB008B-GAL4* (図 3-9 A) (Aso et al., 2014; Vogt et al., 2014) である。興味深いことに、 α/β ケニオン細胞での *DopR1* のノックダウンにより長期記憶特異

的な記憶障害が観察されたが、MBON- $\alpha 1$ の場合は観察されなかった (図 3-9 B, C)。

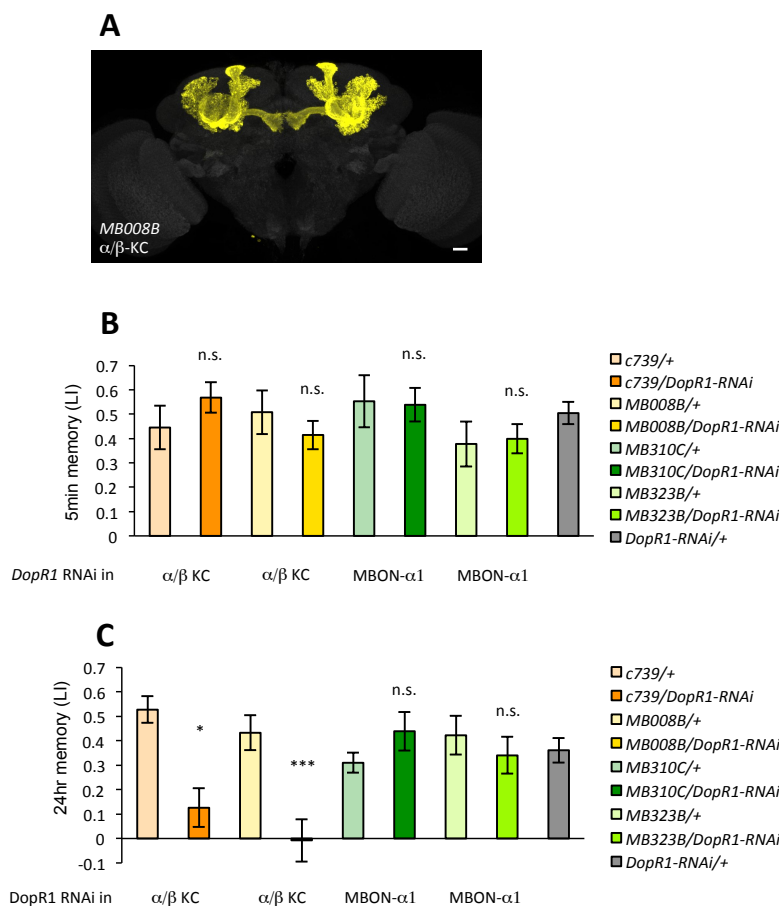


図 3-9 DopR1 は α/β ケニオン細胞で長期記憶に必要である

(A) *MB008B-GAL4* の発現パターン。

(B) α/β ケニオン細胞、MBON- $\alpha 1$ で *DopR1* をノックダウンしても短期記憶は正常である。 $n = 7-22$ 。

(C) α/β ケニオン細胞で *DopR1* をノックダウンすると長期記憶が阻害される。 $n = 10-27$ 。

スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。棒グラフは平均 \pm 標準誤差。*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, n.s.: $P > 0.05$ 。

上記の結果は DopR1 が MBON- $\alpha 1$ ではなく α/β ケニオン細胞で機能することを示唆している。これをさらに確かめるため、*DopR1* 変異体のレスキュー実験を行った。*dumb2* は piggyBac トランスポゾンベクターが *DopR1* 遺伝子の第一イントロンに挿入された変異体で、その発現レベルが強く抑制され、短期報酬記憶に障害が見られることが報告されている (Kim et al., 2007; Liu et al.,

2012)。長期記憶をテストしてみたところ、*dumb2*には短期記憶障害だけでなく長期記憶障害もあることが観察された（図 3-10 B、左端の棒グラフ）。この変異体バックグラウンドで、ケニオン細胞に特異的な *GAL4* 系統である *MB247-GAL4* (Aso et al., 2009; Zars et al., 2000)を用いて DopR1 を発現させたところ、短期記憶と長期記憶の両方で野生型と同様な記憶が観測された（図 3-10）。

以上の結果をまとめると、DopR1 依存的な長期記憶は MBON- α 1 ではなく α/β ケニオン細胞で形成されるといえる。

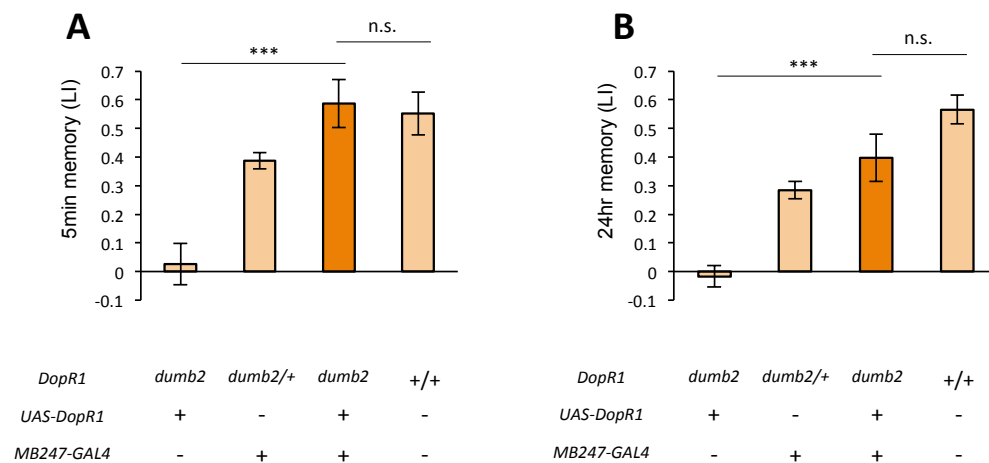


図 3-10 ケニオン細胞での DopR1 発現は変異体の記憶障害をレスキューする *dumb2* のホモ変異体（左端）は短期記憶（A, $n = 5-10$ ）と長期記憶（B, $n = 7-13$ ）の両方で非常に強い記憶障害を示す。ケニオン細胞で DopR1 を発現することにより（右から二つ目、濃い橙色）、野生型（右端）と統計的に変わらない記憶スコアを示す。
棒グラフは平均 \pm 標準誤差。***: $P < 0.001$, n.s.: $P > 0.05$ 。

α/β ケニオン細胞からの神経伝達が記憶形成時に必要である

MBON- α 1 からの神経伝達が長期記憶形成に必要であることが示されたため（図 3-7）、その前シナプス細胞である α/β ケニオン細胞（図 0-2）からの神経伝達も長期記憶形成に必要であることが疑われる。この可能性を検証するため、 α/β ケニオン細胞からの神経伝達阻害を行った（図 3-11）。興味深いことに、

PAM- $\alpha 1$ や MBON- $\alpha 1$ と同様、 α/β ケニオン細胞の学習時の神経伝達阻害も、長期記憶に特異的な記憶障害をもたらした (図 3-11、B, C)。また、低温下で記憶学習を行った場合、記憶障害は観察されなかった (図 3-11、D)。図 3-9、3-10 で得られた結果と合わせて考えると、 α/β ケニオン細胞で *DopR1* を介した記憶痕跡が、MBON- $\alpha 1$ を介して PAM- $\alpha 1$ にフィードバックし、長期記憶を形成するというモデルを示唆する。

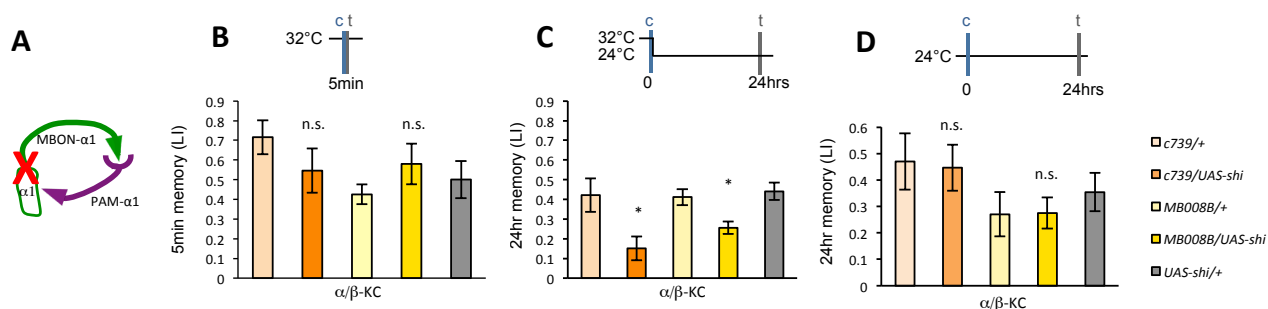


図 3-11 α/β ケニオン細胞からの神経伝達は長期記憶形成時に必要である

(A) α/β ケニオン細胞からの神経伝達を阻害した。

(B) 短期記憶は α/β ケニオン細胞を必要としない。 $n = 7-9$ 。

(C) 長期記憶形成には α/β ケニオン細胞からの神経伝達が必要である。 $n = 7-20$ 。

(D) 低温下で長期記憶は正常である。 $n = 6-9$ 。

棒グラフは平均 \pm 標準誤差。*: $P < 0.05$, n.s.: $P > 0.05$ 。

長期記憶は MBON- $\alpha 1$ を介して読み出される

長期記憶の痕跡が記憶形成時に MBON- $\alpha 1$ を介して出力されるというモデルを考えると (上記参照)、長期記憶の読み出しにも MBON- $\alpha 1$ が関与していることが考えられる。この可能性を検討するため、MBON- $\alpha 1$ からの神経伝達阻害を学習時ではなく記憶テスト時に行ったところ、学習後 24 時間の記憶スコアは有意に低下した (図 3-12 A)。一方、PAM- $\alpha 1$ を同様に阻害しても、記憶スコアの低下は観察されなかった (図 3-12 B)。従って長期記憶はキノコ体の $\alpha 1$ 領域から読み出されると考えられる。

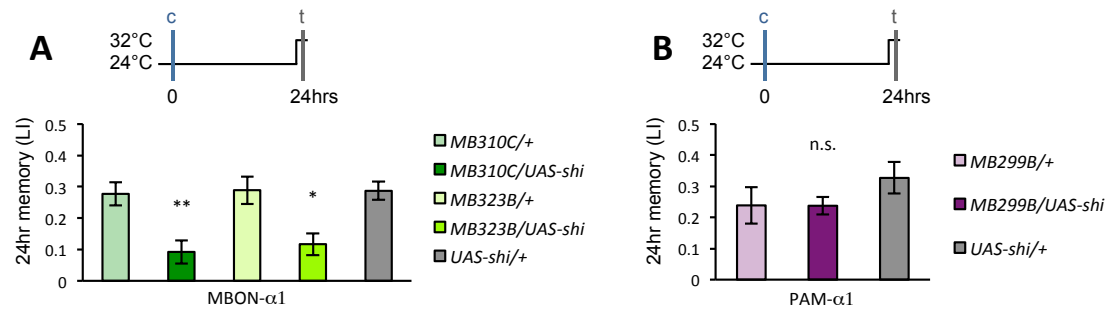


図 3-12 MBON-α1からの神経伝達は長期記憶の読み出しに必要である

(A) 長期記憶テスト時に MBON-α1からの神経伝達阻害を行うと記憶障害が観察される。 $n = 11-20$ 。

(B) PAM-α1からの神経伝達は必要でない。 $n = 7-10$ 。

棒グラフは平均±標準誤差。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$, n.s.: $P > 0.05$ 。

フィードバック報酬回路は記憶の固定化に必要である

PAM-α1 が NMDA 受容体を介した興奮性のフィードバックを MBON-α1 から受容する (図 3-8) と考えると、このフィードバック回路の神経活動が学習後もしばらく持続するのではないかと考えられる。この可能性を検証するため、PAM-α1、MBON-α1、α/βケニオン細胞からの神経伝達を学習と記憶テストの間、一時的に阻害し、長期記憶を測定した (図 3-13)。すると興味深いことに、学習直後に一時間各細胞種を阻害した場合に有意な記憶障害が観察された (図 3-14 A, C, E)。一方、同様の神経阻害を学習 22 時間後に行った場合には記憶障害は観察されなかった (図 3-13 B, D, F)。以上の結果は、PAM-α1、MBON-α1、α/βケニオン細胞から構成されるフィードバック報酬回路が学習後しばらく神経活動を持続させ、α/βケニオン細胞で形成された記憶痕跡を固定化するというモデルを支持する。

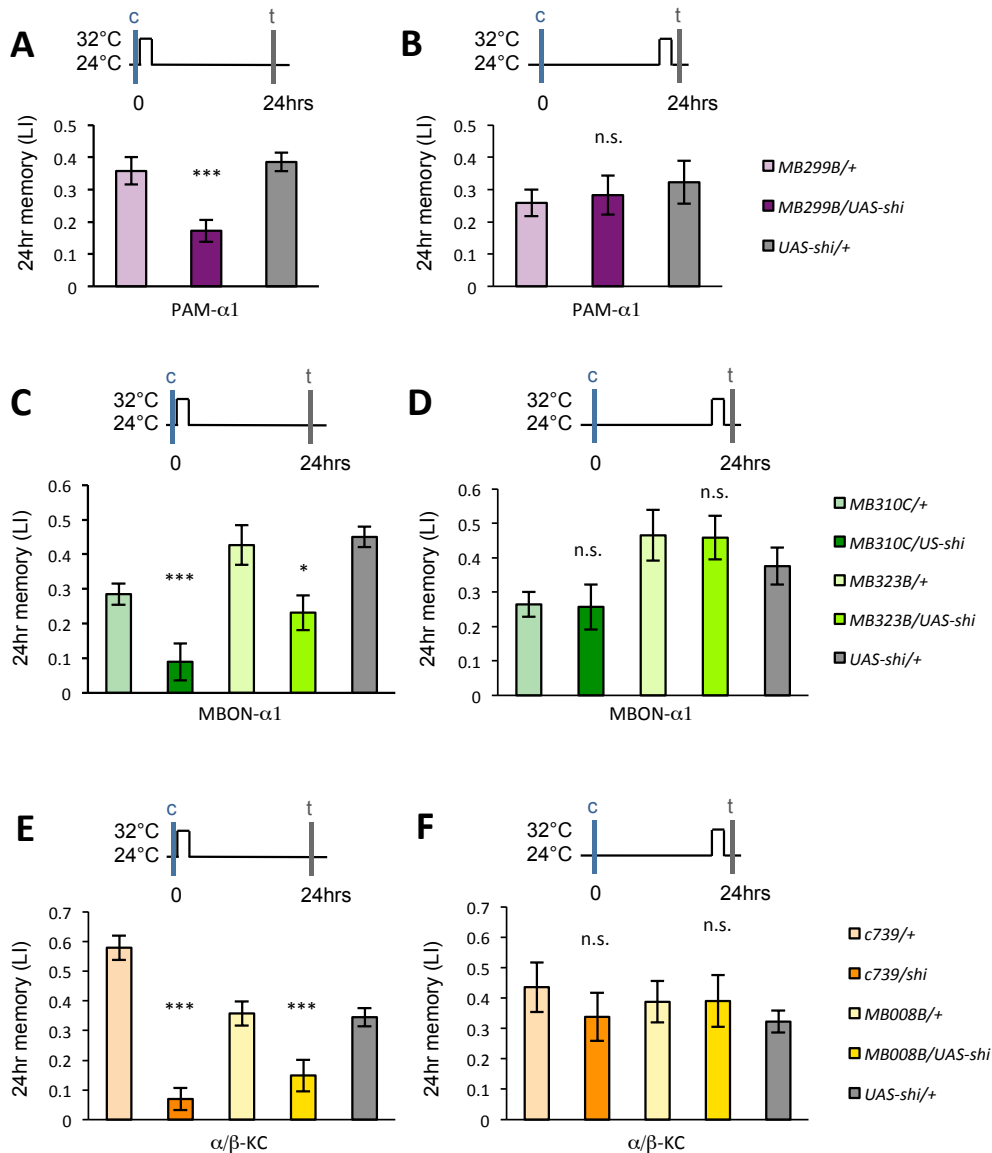


図 3-13 フィードバック報酬回路は学習後にも必要である

(A, C, E) 学習直後、一時間各神経細胞種からの神経伝達阻害を行うことにより長期記憶の固定化が阻害される (A: $n = 15-22$, C: $n = 14-34$, E: $n = 7-15$)。

(B, D, F) 学習 22 時間後、一時間神経伝達阻害を行っても長期記憶は阻害されない (B: $n = 14-15$, D: $n = 13-23$, F: $n = 12-15$)。

棒グラフは平均 \pm 標準誤差。*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, n.s.: $P > 0.05$ 。

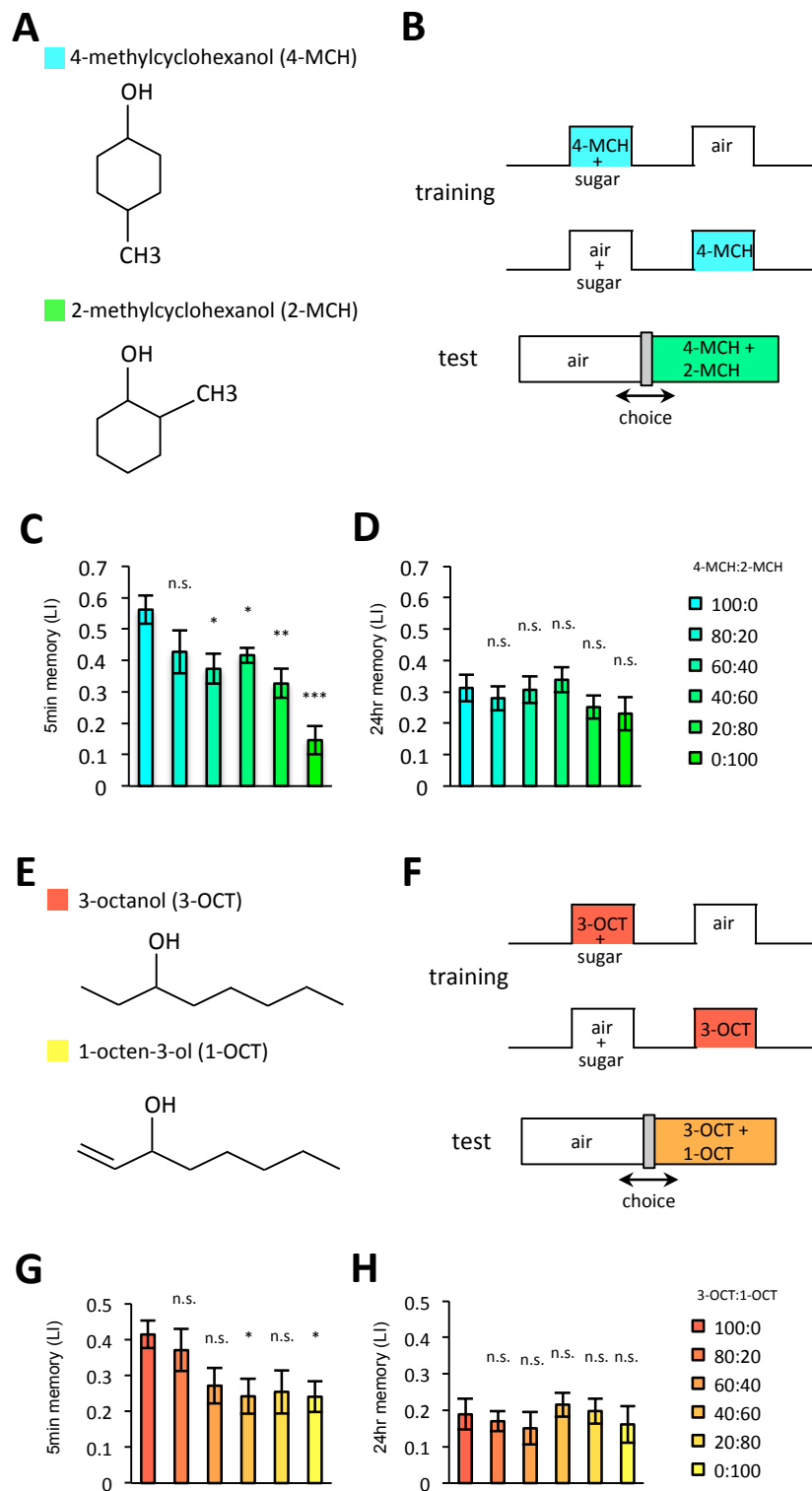
長期記憶は匂い特異性を犠牲にして形成される

ショウジョウバエにおいて連合記憶は、提示された匂いに反応する特定のケ

ニオン細胞の発火と、砂糖報酬や電気ショック罰を伝達するドーパミン放出が学習時に同期し、特定のケニオン細胞からの出力が変化することで形成されることが考えられている（図 0-2）（Gerber et al., 2004; Waddell, 2013）。ところが本章では、報酬性のドーパミン神経からの神経伝達が学習後も必要であることが示された（図 3-13）。匂い刺激の存在しない学習後のドーパミン放出は、その他のケニオン細胞に非特異的な変化を与えてしまうかもしれない。その結果、長期記憶の匂い特異性は短期記憶に比べて低いという可能性が考えられる。この可能性を検証するため、野生型ショウジョウバエを用いて短期記憶と長期記憶の匂い特異性を比較した。通常の嗅覚報酬学習では、二種類の匂いをショウジョウバエに対して提示し、片方の匂いと砂糖報酬を連合させる（図 0-1）。特定の匂いに対する特異性を調べるため、ここでは一種類の匂い

（4-methylcyclohexanol: 4-MCH）のみを用いて学習を行い、その匂いと化学構造が類似した匂い（2-methylcyclohexanol: 2-MCH）を用いて記憶テストを行った（図 3-14 A, B）。学習時には、片方のグループには 4-MCH と同時に砂糖報酬を提示し、別のグループには 4-MCH と砂糖を分けて提示した。記憶テストでは、4-MCH と 2-MCH との混合物を含んだアームと、匂い無しのアームの間での匂い選択行動を測定し、記憶スコアを算出した。匂い混合物は、4-MCH : 2-MCH の比を規則的に変えることで作成した（100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100）。記憶の匂い特異性が高くなればなるほど、2-MCH の増加により記憶スコアが低くなることが予想される。この条件で短期記憶と長期記憶を測定したところ、短期記憶と長期記憶のスコアのパターンに大きな違いが見られた:短期記憶のスコアは 2-MCH の比が大きくなるにつれて急激に低下したのに対し（図 3-14 C）、長期記憶においては低下の度合いは緩やかであった（図 3-14 D）。別の匂いペア（3-octanol: 3-OCT と 1-octen-3-ol: 1-OCT、図 3-14 E, F）を用いて同様の実験を行った場合も、類似した結果を得た（図 3-14 G, H）。以上の結果から、砂糖を用いた嗅覚報酬記憶は時間が経つにつれ、その匂い特異性が低下することが明らかになった。記憶の安定性と匂い特異性の間にはトレードオフがあるのかもしれない。このトレードオフには、フィードバック回路

によって維持される学習後のドーパミン放出が関わっている可能性が考えられる。



- (前ページ) 図 3-14 長期記憶は短期記憶に比べて匂い特異性が低い
- (A, D) 使用した化合物。
- (B, F) 実験模式図。学習時は、片方のグループには特定の匂い(4-MCH または 3-OCT)と砂糖報酬を連合させる。もう片方のグループには、匂いと砂糖を別々に与える。記憶テストでは、匂い無しのチューブと、学習で使った匂いと異なる匂いの混合物の間で匂い選択を行わせた。
- (C, G)短期記憶は、記憶テスト時に異なる匂いを混ぜることで読み出し効率が急激に落ちる ($n = 16$ (C), $n = 20$ (G))。
- (D, H)長期記憶は、異なる匂いを混ぜても大きく変わらない ($n = 20$ (D), $n = 24$ (H))。各グループの記憶スコアを、学習とテストで同一の匂いを用いた場合のスコア (左端の棒グラフ) と統計的に比較した。
- 棒グラフは平均 \pm 標準誤差。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, n.s.: $P > 0.05$ 。

考察

自動実験装置の開発

第1部ではまず大規模行動実験のため、電気ショックと匂いの連合学習の全過程を全自動で行う実験装置を開発した。この実験装置の導入により、実験の大幅な簡便化による効率化を実現した。また、本装置はコンピュータで刺激の提示を制御するため、手作業で行った場合に比べ正確なタイミングで刺激を与えることができる。匂いと電気ショックの連合学習において、刺激提示のタイミングは学習効率に非常に重要である (Tanimoto et al., 2004; Tully and Quinn, 1985)。従って本装置を用いて効率的かつ安定した行動実験を行うことができる。次に、記憶テストにおける個体カウントを自動化する装置を開発した。この自動記憶テスト装置により実験が簡便化しただけでなく、嗅覚連合記憶の読み出し時のショウジョウバエの行動について、高い時間解像度で観察することが可能となった。

Quinnらが1974年にショウジョウバエの嗅覚学習を報告して以来 (Quinn et al., 1974)、40年以上にわたって分子生物学的、神経細胞学的研究が行われてきた。しかし記憶テストにおいて、そのほとんどはテスト開始一定時間後におけるT迷路における個体比にのみ着目してきた。しかし生態系においては、記憶した刺激に対し素早く反応することが重要な場面もあるはずであり、記憶の読み出し速度は重要である。嗅覚記憶の読み出し速度に着目した研究として、Chabaudらの報告がある (Chabaud et al., 2010)。Chabaudらは、電気ショックと匂いの連合記憶について、記憶テスト開始直後、30秒後、60秒後、120秒後、180秒後の記憶スコアを測定することで、記憶の読み出し速度を求めた。しかし本章で報告した記憶テスト装置を用いることによって、記憶の読み出し速度をより高い時間解像度で求めることができる (図1-6、図1-7)。また、将来的にはハイスピード撮影装置や個体トラッキングプログラムと組み合わせることで、さらに詳細な行動の解析も可能である。

本章では、砂糖と匂いを用いた短期報酬記憶と長期報酬記憶について読み出し速度の比較を行い、長期記憶の読み出しが短期記憶に比べて遅いことを報告した（図1-7, 1-8）。ヒトを対象とした心理学的研究でも、学習後時間が経つにつれて記憶の読み出しにより長い時間がかかることが報告されている（Anderson, 1976）。ショウジョウバエには、短期報酬記憶と長期報酬記憶はキノコ体の異なる領域で形成される（Cervantes-Sandoval et al., 2013; Huetteroth et al., 2015; Trannoy et al., 2011; Yamagata et al., 2015）。また、長期記憶の形成に特異的に必要な遺伝子が多数同定されている（Philips et al., 2013）。このような神経細胞学的、分子生物学的な差異が読み出し速度の違いを生み出しているのかもしれない。ショウジョウバエの豊富な遺伝学ツールを活かして神経回路や分子メカニズムの解析を行うことにより、読み出し速度がどのように決定されるのかを今後解明することができるであろう。

嗅覚罰記憶と嗅覚報酬記憶は異なる出力神経細胞種を必要とする

第2部ではこれまでに知られているほぼ全てのキノコ体出力神経細胞種を対象に、嗅覚罰記憶、嗅覚報酬記憶の二時間記憶に対する必要性を検討した。その結果、嗅覚罰記憶にはMBON- γ 1pedc> α/β が、嗅覚報酬記憶にはMBON- γ 5 β '2a、MBON- β '2mp、MBON- α 1、MBON- γ 2 α '1、MBON- α '2が必要であることが示唆された。これらをもとに、嗅覚罰記憶と嗅覚報酬記憶が異なる出力神経細胞によって読み出されるものと考えられる（図2-1、下段）。本章の結果はしかし、その他の出力神経細胞種の嗅覚記憶への関与を否定するものではない。これは以下の二つの理由による：(1) 複数の細胞種が互いの機能を補い合うため、単一細胞種の機能阻害では異常が起きない可能性。今回用いた*split GAL4*系統は、その多くが特定の細胞種に特異的なGAL4発現をもつ。従って、細胞種の機能を高い解像度で解明できる。一方、複数の細胞種間で記憶に関する機能が重複していた場合、一細胞種を阻害しただけでは記憶障害が見られないかもしれない。実際、V2クラスターという出力神経細胞の一群を神経阻害すると嗅覚罰記憶の読み出しが阻害されるという報告があるが（Sejourne et al., 2011）、本章では特

異性の高い *split GAL4* 系統を使ったため同様の結果を得ることはできなかった。複数の細胞種を標識する *GAL4* 系統を使った行動解析により、さらに多くの重要な細胞種が明らかになるかもしれない。(2) *Shi^{ts}* の発現量が不十分であった可能性。発現量の比較的高い *UAS-Shi^{ts}* を用いた一次スクリーニングで観察された記憶障害が、発現量の比較的低い *UAS-Shi^{ts}* を用いた二次スクリーニングでは観察されない例が散見された (図2-4、図2-8)。これは、発現量の高い *UAS-Shi^{ts}* を用いた際に細胞死などが誘導され、神経回路に非特異的な影響がもたらされた可能性もあるが、*Shi^{ts}* の発現量が二次スクリーニングで十分でなかったため記憶障害が観察されなかった可能性がある。今後、発現量をより最適化した実験を行うことで、この他にも重要な細胞種が同定されるかもしれない。

嗅覚罰記憶を担うキノコ体神経回路

第2部の結果により、 $\gamma 1$ 領域および peduncle 領域に投射するドーパミン細胞 (*PPL1- $\gamma 1$ pedc > α/β*) と出力神経細胞 (*MBON- $\gamma 1$ pedc > α/β*) が嗅覚罰記憶に必要であることが示され (図 2-4、図 2-5)、この領域で嗅覚罰記憶が形成され、読み出されることが示唆された。このドーパミン神経細胞種を匂い提示と同時に強制発火させると、電気ショックを与えることなく嗅覚罰記憶が形成される (Aso et al., 2012; Aso et al., 2014b)。ドーパミン受容体 *DopR1* は嗅覚罰記憶に必須であるが (Kim et al., 2007)、 γ ケニオン細胞での発現で十分であることが変異体のレスキュー実験から示されている (Qin et al., 2012)。本研究の結果と合わせると、ドーパミンによる電気ショックの罰情報は $\gamma 1$ 領域に伝達されることが示唆される。また、本章で用いたものと同じ *split GAL4* 系統群を用いた機能スクリーニングにより、電気ショックと色覚の連合学習においても同じドーパミン神経細胞と出力神経細胞のセットが必要であることが明らかになった (Aso et al., 2014b)。

以上の結果は、電気ショックの罰情報は $\gamma 1$ 領域に *PPL1- $\gamma 1$ pedc > α/β* により伝達され、 γ ケニオン細胞で嗅覚あるいは色覚情報と連合され、*MBON- $\gamma 1$ pedc > α/β* により出力されるというモデルを強く支持する (図 2-7)。

MBON- γ 1pedc> α/β は、その軸索終末をキノコ体外だけでなくキノコ体内の α/β 葉にも投射する (Aso et al., 2014)。これまでの研究により、長期罰記憶の読み出しには α/β 葉からの神経伝達が重要であることが示唆されてきた (Blum et al., 2009; Cervantes-Sandoval et al., 2013; Isabel et al., 2004; Pascual and Preat, 2001; Yu et al., 2006)。一方、罰情報を伝達するドーパミンは γ 葉で受容される (Qin et al., 2012)。このことから、 γ ケニオン細胞で形成された記憶痕跡が α/β ケニオン細胞へ伝達されているのではないかという仮説がある。この機能を MBON- γ 1pedc> α/β が担っているかもしれない。

嗅覚報酬記憶を担うキノコ体神経回路

嗅覚報酬記憶には、罰記憶に比べて多くの出力神経細胞種の必要性が示唆された。報酬情報は、キノコ体の特定領域に投射する PAM クラスターというドーパミン細胞群によってキノコ体に伝達される (Burke et al., 2012; Liu et al., 2012)。最もシンプルな神経回路モデルは、PAM クラスターの投射領域で報酬記憶が形成され、同領域から出力する神経によって読み出されるというものである (Gerber et al., 2004)。今回同定された神経細胞種の一部 (MBON- γ 5 β '2a、MBON- β '2mp、MBON- α 1) は PAM クラスターが投射する区画から出力し、このモデルと一致する機能をもっているかもしれない。一方 MBON- γ 2 α '1、MBON- α '2 が出力するキノコ体領域には PAM クラスター細胞は投射しない。この領域に投射するドーパミン細胞群は報酬記憶に必要でないことが示されている (Schwaerzel et al., 2003)。これはなぜであろうか。一つ目の可能性は、これらの出力神経細胞種は記憶の読み出しではなく記憶の形成あるいは固定化に必要であるというものである。本章の実験では学習から記憶テストまで高温下で *Shits* による神経阻害を行ったため、これらの細胞種が記憶学習行動のどの段階で必要であるかを示すことはできない。この可能性を検証するには、神経阻害の時間を限定する実験が必要である。先行研究により、MBON- γ 2 α '1 および MBON- α '2 のシナプス前細胞である α'/β' ケニオン細胞からの神経伝達が、記憶の読み出しではなく固定化に必要であるということが報告されており

(Krashes et al., 2007)、 α'/β' ケニオン細胞からの神経伝達が MBON- $\gamma 2\alpha'1$ および MBON- $\alpha'2$ を通して記憶を固定化するという可能性を示唆する。二つ目の可能性は、これらの出力神経細胞種は記憶の読み出しに必要であるが、PAM 細胞の投射領域から別の領域に記憶が伝達されるというものである。先行研究により、キノコ体全体に投射する 2 つの巨大な神経細胞 (DPM 神経、APL 神経) からの神経伝達が学習後の一定時間必要であることが報告されている (Keene et al., 2006; Keene et al., 2004; Pitman et al., 2011)。また、一部の出力神経細胞種 (MBON- $\gamma 1$, MBON- $\gamma 4$, MBON- $\beta 1$) はキノコ体外だけでなくキノコ体内にも軸索終末を投射し、フィードフォワード回路を形成する (Aso et al., 2014)。これらの複雑なネットワークが、記憶の「伝達」を担っているのかもしれない。ケニオン細胞においてカルシウムイメージングを行った先行研究により、PAM クラスター細胞の強制発火と匂い提示の同期により、PAM クラスターの投射領域だけでなくキノコ体の様々な区画で匂い刺激に対する反応が変化することが報告されている (Boto et al., 2014)。キノコ体を構成する細胞種の機能や性質を多角的に調べることにより、複雑なネットワークの動作原理が明らかになるであろう。

砂糖の代わりにエタノールを用いることでも、長期報酬記憶の形成を誘導することができる (Kaun et al., 2011)。同じ *split GAL4* 系統を用いたスクリーニングにより、本章で同定された砂糖学習に重要な細胞種の多く (MBON- $\gamma 5\beta'2a$, MBON- $\beta'2mp$, MBON- $\gamma 2\alpha'1$, MBON- $\alpha'2$) がエタノールを用いた報酬記憶にも同様に必要であることが示された (Aso et al., 2014b)。従って、砂糖による報酬記憶とエタノールによる報酬記憶は一部共通した出力回路によって読み出されているのかもしれない。ところが MBON- $\alpha 1$ に関しては、砂糖を用いた報酬記憶への必要性は示されたが、エタノールを用いた報酬記憶への必要性は示されなかった (図 2-11) (Aso et al., 2014b)。第 3 部の結果から、MBON- $\alpha 1$ は栄養情報を伝達する PAM- $\alpha 1$ からの報酬情報を増強することが示唆される (図 3-4, 3-15)。このフィードバック回路は栄養情報を記憶するため特異的に機能する可能性が考えられる。

報酬フィードバック回路によって長期報酬記憶が形成される

第3部では、*split GAL4* 系統を用いたドーパミン作動性神経のスクリーニングにより PAM- $\alpha 1$ が報酬記憶に関与することを明らかにし、PAM- $\alpha 1$ 、MBON- $\alpha 1$ 、 α/β ケニオン細胞によって構成されるフィードバック報酬回路を通して長期記憶が形成されることを明らかにした。関連する先行研究の知見とも合わせ、報酬記憶形成メカニズムについて以下に考察する。

短期記憶と独立な長期記憶形成

長期記憶が、短期記憶を基にして形成されるという仮説は、比較的広く信じられている (Isabel et al., 2004; Tully et al., 1994)。しかしショウジョウバエの嗅覚報酬記憶に関しては複数の研究報告から、長期記憶と短期記憶が独立に形成されるのではないかという仮説が近年提唱されている。Trannoy らは、短期報酬記憶と長期報酬記憶はそれぞれ γ ケニオン細胞と、 α/β ケニオン細胞に別々に形成されると提唱した (Trannoy et al., 2011)。匂いと砂糖報酬の情報を連合する分子であると考えられているアデニル酸シクラーゼをコードする *rutabaga* 遺伝子の変異体は強い記憶障害を示すが、 γ ケニオン細胞で野生型の *rutabaga* を発現させることで短期記憶が回復する。一方、 α/β ケニオン細胞で発現させると短期記憶は回復されないが長期記憶が回復された (Trannoy et al., 2011)。従って短期記憶障害があっても長期記憶は形成可能であることが明らかになった (Trannoy et al., 2011)。ドーパミン受容体 *DopR1* が α/β ケニオン細胞で長期記憶に必要であるが短期記憶には必要でないという本章の結果 (図 3-9) はこれを裏付ける。さらに山方らは、報酬性のドーパミン細胞クラスターである PAM クラスターを構成する細胞を二種類に分割し、片方の強制発火を匂い提示と連合させた場合には短期記憶のみが形成され、別の細胞群からは長期記憶のみが形成されることを報告し、これらの細胞群をそれぞれ stm-PAM (short-term memory PAM)、ltm-PAM (long-term memory PAM) と命名した (Yamagata et al., 2015)。本章でその機能を報告した PAM- $\alpha 1$ は ltm-PAM に含まれる。本

章はこれをさらに掘り進め、特定のドーパミン細胞種からの神経伝達が長期記憶を誘導する神経回路を解析した。ショウジョウバエだけでなく、サルでも同様にフレキシブルな記憶と安定した記憶は異なる領域に独立に形成されることが報告されている (Kim et al., 2014; Kim and Hikosaka, 2013)。従って短期記憶と長期記憶の独立な処理は種を超えて保存されている可能性がある。

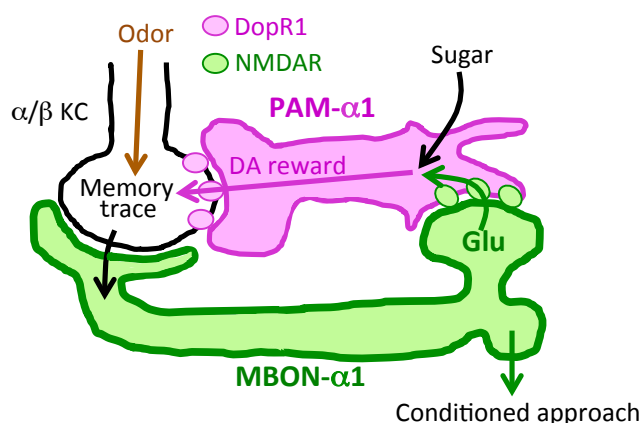


図 3-15 フィードバック報酬回路により長期記憶が形成される
長期報酬記憶の形成モデル。PAM- $\alpha 1$ によって伝達される砂糖報酬と匂い情報が α/β ケニオン細胞で連合される。この記憶痕跡は MBON- $\alpha 1$ によって PAM- $\alpha 1$ にフィードバックし、PAM- $\alpha 1$ 上の NMDA 受容体を通してドーパミン放出量を調節する。長期報酬記憶は MBON- $\alpha 1$ を通して読み出され、条件付け匂い誘引行動 (conditioned approach) を引き起こす。

フィードバック報酬回路の機能

ショウジョウバエの連合学習系において、ドーパミンは報酬情報あるいは罰情報を単純に伝達するという見方がこれまで一般的であった (Gerber et al., 2004; Waddell, 2013)。しかし本章の実験結果から、 α/β ケニオン細胞で形成された記憶痕跡が MBON- $\alpha 1$ を通して PAM- $\alpha 1$ に伝達され、報酬性のドーパミン放出を調節するのではないかとモデルを立てることができる (図 3-15)。長期記憶形成には NMDA 受容体が PAM- $\alpha 1$ で必要であった (図 3-8)。NMDA 受容体は後シナプス細胞が脱分極状態のときにのみ開くことから (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984)、PAM- $\alpha 1$ は砂糖報酬と記憶中枢からの記憶痕跡を統合し、ドーパミン放出量を増強あるいは持続するのではないかと考えることが

できる。言い換えると、情報の統合がケニオン細胞だけではなく PAM- α 1 でも起こることで、長期記憶の形成を誘導するドーパミン放出が誘導されるというモデルである。先行研究により、ドーパミン放出のみでも後シナプス細胞に変化が起こること (Gervasi et al., 2010; Tomchik and Davis, 2009)、タンパク質合成依存的な長期記憶の形成には大きなエネルギー消費が伴うこと (Mery and Kawecki, 2005; Placais and Preat, 2013) が報告されている。本章で報告したフィードバック報酬回路は、「高価な」長期記憶の形成を、明白な条件付け刺激の存在下に制限するメカニズムとなっているかもしれない。

PAM- α 1 からのドーパミン放出は、学習時だけでなく学習後も必要であった (図 3-13 A, B)。MBON- α 1, α/β ケニオン細胞からの神経伝達も同様に必要であることから (図 3-13 C-F) (Huang et al., 2012)、フィードバック回路がドーパミン放出の持続に関わっていると考えられる (図 3-15)。長期記憶の固定化には PAM- α 1 だけでなく他のドーパミン細胞種からの神経伝達も必要であることが報告されているが (Musso et al., 2015; Placais et al., 2012)、学習後ドーパミン放出が持続するメカニズムは不明であった。げっ歯類を用いた研究においても同様に、長期記憶の固定化に学習後のドーパミン放出が必要であるという報告があり (Rossato et al., 2009)、海馬から報酬性ドーパミン神経へのフィードバック回路の存在が提唱されてきたが (Lisman and Grace, 2005)、その神経回路実態は明らかでなかった。本研究はフィードバック報酬回路の動作原理の解明の先がけとなった。上記に加え、長期記憶の匂い特異性は短期記憶に比べて低いことが今回明らかとなった (図 3-14)。ミツバチやマウスを用いた研究でも同様の結果が報告されている (Stach and Giurfa, 2005; Wiltgen and Silva, 2007)。自然界において報酬や罰を予測する刺激は時間の経過とともに変化することが考えられるため、刺激特異性の低い、より一般性の高い長期記憶を形成することは理にかなった生き残り戦略であるかもしれない。

最近のキノコ体外部神経の解剖学研究から、本章で報告した PAM- α 1 と MBON- α 1 以外にも多くの細胞種について、特定のドーパミン細胞種の樹状突起と特定の出力細胞種の軸索終末がキノコ体外で近接している可能性が指摘さ

れている (Aso et al., 2014)。哺乳類やミツバチを用いた先行研究でも、記憶痕跡と報酬あるいは罰を伝達する神経回路との相互作用の存在が指摘されている (Cohen et al., 2012; Hammer, 1993; Mireniewicz and Schultz, 1994; Schultz, 2013)。今後、記憶痕跡と報酬、罰情報との様々な相互作用について、その生物学的意義や動作原理が明らかになるであろう。

長期報酬記憶の読み出し回路

本章では、MBON- $\alpha 1$ は長期報酬記憶の形成や固定化だけでなく、読み出しにも必要であることを示した (図 3-12)。MBON- $\alpha 1$ は、キノコ体の $\alpha 1$ から SIP, SLP 領域に軸索終末を投射する (図 3-5)。先行研究により、キノコ体 α 葉の先端の $\alpha 3$ 領域から出力する MBON- $\alpha 3$ も、長期報酬記憶の読み出しに必要であることがわかっている (Placais et al., 2013)。興味深いことに、MBON- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 3$ の軸索終末は SIP 領域において互いに非常に近接していることが報告されており (Aso et al., 2014)、共通の後シナプス細胞に接続しているかもしれない。長期報酬記憶は、 α/β ケニオン細胞から読み出される (Cervantes-Sandoval et al., 2013; Trannoy et al., 2011)。従って、 α/β ケニオン細胞で形成された長期報酬記憶は、MBON- $\alpha 1$ と MBON- $\alpha 3$ を介して読み出され、SIP 領域で収束し、連合された匂いへの誘引行動を引き起こすのではないかと考えられる (図 3-15)。

材料と方法

実験動物

野生型ショウジョウバエとして 24°C で飼育した *Canton-S* を用いた。

split GAL4 系統は、Jenett らが報告したエンハンサーDNA フラグメント (Jenett et al., 2012) により転写活性化ドメインと GAL4 の DNA 結合ドメインにそれぞれロイシンジッパーを結合したもの (p65ADZp と ZpGAL4DBD) (Pfeiffer et al., 2010) をゲノムに挿入して作製したものである (Aso et al., 2014)。

第 2 部の一次スクリーニングでは各 *split GAL4* 系統の雄と *w;; pJFRC100-20XUAS-Shibire^{ts1}, in VK00005* (Pfeiffer et al., 2012) の雌を交配し、F1 世代のショウジョウバエを使った。コントロール (*UAS-Shi^{ts/+}*) は、*split GAL4* 系統の代わりに *white* 変異体の雄を用いた交配の F1 世代である (*split GAL4* 系統は *white* 変異を有するため)。ショウジョウバエは 24°C で飼育した。二次スクリーニングでは各 *split GAL4* 系統の雄と *UAS-shibire^{ts1} x1* の雌を交配し、F1 世代を使った。*UAS-shibire^{ts1} x1* は、北本が作製した *UAS-shibire^{ts1}* の DNA フラグメントが複数挿入された系統を (Kitamoto, 2001)、Thomas Preat の研究室 (Centre National de la Recherche Scientifique) で染色体組み替えにより単一挿入にしたものである。GAL4 活性を弱く抑えるため、18°C で飼育した。

第 3 部で用いられた *R72D01-LexA* は Pfeiffer らにより記載された方法で作成され、ゲノム上の *attP40* に挿入した (Pfeiffer et al., 2010)。 *c739-GAL4* は Yang らにより報告されたエンハンサートラップ GAL4 系統である (Yang et al., 1995)。PAM 細胞種の一次スクリーニング (図 3-1) には各 *split GAL4* 系統の雄と *w;; pJFRC100-20XUAS-Shibire^{ts1}, in VK00005* (Pfeiffer et al., 2012) の雌を交配し、F1 世代のショウジョウバエを使った。その他の神経阻害実験 (図 3-4, 3-7, 3-11, 3-12, 3-13) には *w;; UAS-Shi^{ts1} x1* の雌を使用した。コントロール (*UAS-Shi^{ts/+}, GAL4/+*) には、*split GAL4* 系統あるいは *UAS-Shi^{ts1} x1* の代わ

りに *white* 変異体を用いた (*UAS* 系統、*GAL4* 系統に *white* 変異が入っているため)。受容体ノックダウン実験 (図3-8) には *UAS-Nmdar1^{RNAi}* (P(TRiP.HMS02200) attP40), *UAS-Nmdar2^{RNAi}* (P(TRiP.HMS02012)attP40), *UAS-DopR1^{RNAi}* (P(TRiP.HMS02344)attP2) (Ni et al., 2011) の雌をそれぞれの *GAL4* 系統の雄と交配し、F1 世代を実験に使った。コントロールには *UAS* 系統の代わりに *Canton-S*, *GAL4* 系統の代わりに *white* 変異体を用いた。NMDA 受容体ノックダウン実験 (図3-8) では *GAL4* 活性を増強するため、実験前の4-5日間、30°C で飼育した。*DopR1* 変異体 (*dumb2*) のレスキュー実験 (図3-10) には *UAS-DopR1::dumb2* または *Canton-S* の雌と、*MB247-GAL4; dumb2* または *dumb2* の雄を交配し、F1 世代を実験に使った。

二重染色と発現パターンの確認のための抗体染色には以下のレポーター系統を、各 *split GAL4* 系統、*LexA* 系統と交配した: *pJFRC2-10xUAS-mCD8GFP in VK00005* (図 3-5 A-D) (Pfeiffer et al., 2010)、*pJFRC200-10xUAS-IVS-myr::smGFP-HA in attP18* (図 3-3 A; 図 3-6 A-D; 図 3-7 B, C; 図 3-9 A) (Viswanathan et al., 2015)、*pJFRC216-13xLexAop2-IVS-myr::smGFP-V5 in su(Hw)attP8* (図 3-6 A-D) (Nern et al., 2015)。GRASP (図 3-6 E) には *72D01-LexA*, *UAS-CD4::spGFP1-10; LexAop-CD4::spGFP11* (Gordon and Scott, 2009) と *MB310C-GAL4* を交配した。共焦点画像は LSM710 (Zeiss, 図 3-5, 図 3-6, A-D, 図 3-7, B, C, 図 3-9 A) または FV1200 (Olympus, 図 3-6 E) によって撮影した。

ショウジョウバエは標準コーンミール飼料で、特に記載がない限り12時間/12時間の明暗サイクル、24°Cにて飼育し、羽化後3-10日の個体を実験に用いた。

電気ショック匂い学習

匂い提示のためFESTO社の三方電磁弁 (MFH-3-3/4-S)、ebmpapst社の送風機 (RG130/0800-3612) を使用した。送風機は実験装置の下流に配置し (図 1-1)、空気を引く形で使用した。流速はチューブあたり0.75l/分に設定した。電気ショックチューブの作製は、二本の銅線を交互に螺旋状に巻いたアクリル

棒を、アクリルとポリアセタールで作った筒の内側に配置し、最後に銅線の内側のアクリル棒を削り筒状に加工することで作製した。匂いカップはポリアセタールを加工して作製した。制御ソフトはLabview 2011によって作製した。匂い物質として3-octanol (3-OCT) と4-methylcyclohexanol (4-MCH) を用いた。3-OCTと4-MCHはパラフィンオイル (Sigma-Aldrich社) にそれぞれ1%, 2%の割合で薄め、直径14mmの匂いカップに配置した。

電気ショック匂い学習は、弱い赤の光の下で行った。約30-50匹のショウジョウバエを電気ショックチューブに入れ、一定の空気の流れの中で3-OCTと4-MCHをそれぞれ1分間ずつ提示し、片方の匂い提示時に1.5秒間、90Vの直流電流を3.5秒間隔で12回流した。各匂いの提示の間には、匂いを除去するため1分間空気を流した。半分のグループは3-OCTと電気ショックを、残りのグループは4-MCHと電気ショックを連合させ、その記憶スコアを平均した。また、匂い提示の順番による行動変化を避けるため、半分のグループには電気ショックと連合する匂いを先に提示し、残りのグループには後に提示した。

砂糖を用いた報酬学習

砂糖を用いた報酬学習は従来の方法に倣った (Liu et al., 2012)。2Mのスクロース (Sigma Aldrich) 水溶液を濾紙に染み込ませ、一晚乾燥させたものを砂糖報酬として1分間ショウジョウバエに提示した。砂糖報酬は3-OCTあるいは4-MCHと連合した。ショウジョウバエは実験の前、濡れた濾紙とティッシュペーパーのみが入ったバイアルで飢餓状態に置かれた。飢餓状態に置く時間は、記憶テスト時に約10%のショウジョウバエが死亡する程度に決められた (約35-50時間)。

記憶テスト

記憶テスト装置はアクリル板を加工して作製した。匂いカップ、匂い物質、送風機は電気ショック学習と同一なものを用いた。実験は暗闇で行うため、赤外線LED (Osram 720-SFH487P, Mouser electronics社) によってテスト装置

を照射した。ショウジョウバエが壁を登るのを防ぐため、Fluon (Insect-a-Slip, PTFE30, BioQuip Products社) を塗った。撮影にはPoint Grey社のカメラ (FFMV-03M2M) を使った。空気の吸引には電気ショック学習と同様、ebmpapst社の送風機 (RG130/0800-3612) を使用した (チューブあたり流速 0.75l/分)。

電気ショック、あるいは砂糖学習後、ショウジョウバエは濡れた濾紙の入ったバイアルに入れた。一定時間後、ショウジョウバエをT迷路の中央にあるエレベーターに入れ、エレベーターをスライドすることでテストを開始した。毎秒一枚画像を取得し、T迷路の各アームを選択したショウジョウバエの数を、独自に作製したimageJマクロを用いてカウントし、毎秒の記憶スコアを計算した。記憶テストは120秒間行い、最後の10秒間 (第2部) あるいは60秒間 (第3部) の記憶スコアを平均した。

匂い、電気ショック忌避、砂糖誘引行動の測定

匂い忌避行動の測定 (図2-5) は上記の記憶テスト装置を用い、片方の匂いカップに特定の匂いを、もう片方には溶媒のみを入れることで行った。画像処理、忌避スコアの計算は記憶テストと同様である。測定は120秒間行い、最後の10秒間の忌避スコアを平均した。

電気ショック忌避および砂糖誘引行動の測定 (図2-5, 2-9) は従来の方法に倣った (Aso et al., 2010; Liu et al., 2012)。片方のアームに90Vの電気ショックあるいは2Mのスクロース溶液を含ませ乾燥させた濾紙を提示し、ショウジョウバエに120秒間選択させ、個体数をカウントし、忌避あるいは誘引スコアを計算した。

抗体

抗体染色は以前と同様な方法で行い (Aso et al., 2014)、以下の一次抗体をカッコ内の濃度で用いた : rabbit-anti-GFP (1:1000; Invitrogen; A11122), mouse-anti-GFP (1:200; UC Davis/NIH Neuromab Facility; clone N86/38; for GRASP),

rabbit anti-HA (1:300; Cell Signaling Technology)。以下の二次抗体を用いた：
AlexaFluor-488 donkey anti-mouse (1:400; Jackson Labs), Cy3 donkey anti-rabbit
(1:500; Jackson Labs), AlexaFluor-647 donkey anti-rat (1:300; Jackson Labs),
AlexaFluor-488 goat anti-rabbit (1:800; Invitrogen A11034) and AlexaFluor-568 goat
anti-mouse (1:400; Invitrogen A11031)。

統計

読み出し速度の近似（図 1-8）、その他の統計学的比較には Prism5
（GraphPad）を使って行った。データは正規分布の仮定（D'Agostino-Pearson
test）、等分散の仮定（Bartlett test）に反しなかったため、t-test を行った。
post-hoc correction には Bonferroni 法を用いた。 $P < 0.05$ を統計的有意差とした。

謝辞

実験装置の作製は Max Planck Institute of Neurobiology の Andreas Kucher 氏, Stefan Prech 氏、東北大学機器開発研修室の小野寺知美氏、斎藤一真氏、制御ソフトウェアの開発は東北大学電子光理学研究センターの長澤育郎氏、Helmholtz Zentrum の田川嵩展氏の助力により行った。

本研究は、Janelia Research Campus の麻生能功博士、Gerald Rubin 博士によって作製された *split GAL4* 系統、またその発現パターン画像を使って行った。Josh Dubnau 博士 (Cold Spring Harbor Laboratory) 、 Thomas Preat 博士 (CNRS ESPCI-Paris Tech) 、Scott Waddell 博士 (Oxford 大学) 、Bloomington Stock Center (Indiana 大学) , TRiP (Harvard medical school) から提供を受けたショウジョウバエ系統を使用した。

解剖実験において東北大学の阿部綾子氏の助力を得た。Leibniz Institute for Neurobiology の Bertram Gerber 博士、東北大学の筒井健一郎博士、小山佳博士、谷本拓研究室メンバーには研究計画や関連報告についての議論をしていただいた。

以上の方々に対し、ここに謝意を表明する。

結果の第2部で報告した内容、第3部で報告した内容の一部は、それぞれ *eLife* と *PNAS* に掲載された (Aso et al., 2014b; Yamagata et al., 2015)。第3部の内容は 2015 年現在、雑誌投稿中である。

参考文献

- Anderson, J.R. (1976). Language, Memory, and Thought.
- Aso, Y., Grubel, K., Busch, S., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., and Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *Journal of neurogenetics* 23, 156-172.
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R.M., Iyer, N.A., Ngo, T.T., Dionne, H., Abbott, L., Axel, R., Tanimoto, H., *et al.* (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife* 3.
- Aso, Y., Herb, A., Ogueta, M., Siwanowicz, I., Templier, T., Friedrich, A.B., Ito, K., Scholz, H., and Tanimoto, H. (2012). Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. *PLoS genetics* 8, e1002768.
- Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K.R., Vogt, K., Belliart-Guerin, G., Placais, P.Y., Robie, A.A., Yamagata, N., Schnaitmann, C., *et al.* (2014b). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife* 3.
- Aso, Y., Siwanowicz, I., Bracker, L., Ito, K., Kitamoto, T., and Tanimoto, H. (2010). Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Current biology* 20, 1445-1451.
- Blum, A.L., Li, W., Cressy, M., and Dubnau, J. (2009). Short- and long-term memory in *Drosophila* require cAMP signaling in distinct neuron types. *Current biology* 19, 1341-1350.
- Boto, T., Louis, T., Jindachomthong, K., Jalink, K., and Tomchik, S.M. (2014). Dopaminergic modulation of cAMP drives nonlinear plasticity across the *Drosophila* mushroom body lobes. *Current biology* 24, 822-831.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Burke, C.J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M.J., Das, G., Gohl, D., Silies, M., Certel, S., and Waddell, S. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* 492,

433-437.

Burke, C.J., and Waddell, S. (2011). Remembering nutrient quality of sugar in *Drosophila*. *Current biology* 21, 746-750.

Campbell, R.A., Honegger, K.S., Qin, H., Li, W., Demir, E., and Turner, G.C. (2013). Imaging a population code for odor identity in the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 10568-10581.

Cervantes-Sandoval, I., and Davis, R.L. (2012). Distinct traces for appetitive versus aversive olfactory memories in DPM neurons of *Drosophila*. *Current biology* 22, 1247-1252.

Cervantes-Sandoval, I., Martin-Pena, A., Berry, J.A., and Davis, R.L. (2013). System-like consolidation of olfactory memories in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 9846-9854.

Chabaud, M.A., Preat, T., and Kaiser, L. (2010). Behavioral characterization of individual olfactory memory retrieval in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in behavioral neuroscience* 4, 192.

Claridge-Chang, A., Roorda, R.D., Vrontou, E., Sjulson, L., Li, H., Hirsh, J., and Miesenböck, G. (2009). Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell* 139, 405-415.

Cohen, J.Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B.B., and Uchida, N. (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature* 482, 85-88.

de Belle, J.S., and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263, 692-695.

Dethier, V.G. (1976). The Hungry Fly.

Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., and Tully, T. (2001). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411, 476-480.

Feinberg, E.H., Vanhoven, M.K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R.D., Shen, K., and Bargmann, C.I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous

systems. *Neuron* 57, 353-363.

Gerber, B., Tanimoto, H., and Heisenberg, M. (2004). An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Current opinion in neurobiology* 14, 737-744.

Gervasi, N., Tchenio, P., and Preat, T. (2010). PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* 65, 516-529.

Gordon, M.D., and Scott, K. (2009). Motor control in a *Drosophila* taste circuit. *Neuron* 61, 373-384.

Guizar-Sicairos, M., Thurman, S.T., and Fienup, J.R. (2008). Efficient subpixel image registration algorithms. *Opt Lett* 33, 156-158.

Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366, 59-63.

Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., and Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *Journal of neurogenetics* 2, 1-30.

Honegger, K.S., Campbell, R.A., and Turner, G.C. (2011). Cellular-resolution population imaging reveals robust sparse coding in the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 11772-11785.

Huang, C., Zheng, X., Zhao, H., Li, M., Wang, P., Xie, Z., Wang, L., and Zhong, Y. (2012). A permissive role of mushroom body alpha/beta core neurons in long-term memory consolidation in *Drosophila*. *Current biology* 22, 1981-1989.

Huetteroth, W., Perisse, E., Lin, S., Klappenbach, M., Burke, C., and Waddell, S. (2015). Sweet taste and nutrient value subdivide rewarding dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Current biology* 25, 751-758.

Isabel, G., Pascual, A., and Preat, T. (2004). Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304, 1024-1027.

Jenett, A., Rubin, G.M., Ngo, T.T., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B.D., Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., et al. (2012). A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell reports* 2, 991-1001.

Kaun, K.R., Azanchi, R., Maung, Z., Hirsh, J., and Heberlein, U. (2011). A

Drosophila model for alcohol reward. *Nature neuroscience* 14, 612-619.

Keene, A.C., Krashes, M.J., Leung, B., Bernard, J.A., and Waddell, S. (2006). *Drosophila* dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Current biology* 16, 1524-1530.

Keene, A.C., Stratmann, M., Keller, A., Perrat, P.N., Vosshall, L.B., and Waddell, S. (2004). Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* 44, 521-533.

Keene, A.C., and Waddell, S. (2007). *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 8, 341-354.

Keleman, K., Kruttner, S., Alenius, M., and Dickson, B.J. (2007). Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nature neuroscience* 10, 1587-1593.

Keleman, K., Vrontou, E., Kruttner, S., Yu, J.Y., Kurtovic-Kozaric, A., and Dickson, B.J. (2012). Dopamine neurons modulate pheromone responses in *Drosophila* courtship learning. *Nature* 489, 145-149.

Kim, H.F., Ghazizadeh, A., and Hikosaka, O. (2014). Separate groups of dopamine neurons innervate caudate head and tail encoding flexible and stable value memories. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 120.

Kim, H.F., and Hikosaka, O. (2013). Distinct basal ganglia circuits controlling behaviors guided by flexible and stable values. *Neuron* 79, 1001-1010.

Kim, Y.C., Lee, H.G., and Han, K.A. (2007). D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 7640-7647.

Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *Journal of neurobiology* 47, 81-92.

Krashes, M.J., Keene, A.C., Leung, B., Armstrong, J.D., and Waddell, S. (2007). Sequential use of mushroom body neuron subsets during *drosophila* odor memory processing. *Neuron* 53, 103-115.

Krashes, M.J., and Waddell, S. (2008). Rapid consolidation to a radish and protein synthesis-dependent long-term memory after single-session

appetitive olfactory conditioning in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 3103-3113.

Lai, S.L., Awasaki, T., Ito, K., and Lee, T. (2008). Clonal analysis of *Drosophila* antennal lobe neurons: diverse neuronal architectures in the lateral neuroblast lineage. *Development* 135, 2883-2893.

Lin, S., Oswald, D., Chandra, V., Talbot, C., Huetteroth, W., and Waddell, S. (2014). Neural correlates of water reward in thirsty *Drosophila*. *Nature neuroscience*.

Lisman, J.E., and Grace, A.A. (2005). The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46, 703-713.

Liu, C., Placais, P.Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B.D., Aso, Y., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Rubin, G.M., Preat, T., and Tanimoto, H. (2012). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature* 488, 512-516.

Luan, H., Peabody, N.C., Vinson, C.R., and White, B.H. (2006). Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. *Neuron* 52, 425-436.

Mao, Z., and Davis, R.L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front Neural Circuits* 3, 5.

Masek, P., and Scott, K. (2010). Limited taste discrimination in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14833-14838.

Masek, P., Worden, K., Aso, Y., Rubin, G.M., and Keene, A.C. (2015). A dopamine-modulated neural circuit regulating aversive taste memory in *Drosophila*. *Current biology* 25, 1535-1541.

Mayer, M.L., Westbrook, G.L., and Guthrie, P.B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261-263.

McGuire, S.E., Le, P.T., and Davis, R.L. (2001). The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293, 1330-1333.

Mery, F., and Kawecki, T.J. (2005). A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* 308, 1148.

- Mirenowicz, J., and Schultz, W. (1994). Importance of unpredictability for reward responses in primate dopamine neurons. *Journal of neurophysiology* 72, 1024-1027.
- Musso, P.Y., Tchenio, P., and Preat, T. (2015). Delayed dopamine signaling of energy level builds appetitive long-term memory in *Drosophila*. *Cell reports* 10, 1023-1031.
- Nern, A., Pfeiffer, B.D., and Rubin, G.M. (2015). Optimized tools for multicolor stochastic labeling reveal diverse stereotyped cell arrangements in the fly visual system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E2967-2976.
- Ni, J.Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., *et al.* (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nature methods* 8, 405-407.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.
- Pai, T.P., Chen, C.C., Lin, H.H., Chin, A.L., Lai, J.S., Lee, P.T., Tully, T., and Chiang, A.S. (2013). *Drosophila* ORB protein in two mushroom body output neurons is necessary for long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7898-7903.
- Pascual, A., and Preat, T. (2001). Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294, 1115-1117.
- Pech, U., Pooryasin, A., Birman, S., and Fiala, A. (2013). Localization of the contacts between Kenyon cells and aminergic neurons in the *Drosophila melanogaster* brain using SplitGFP reconstitution. *The Journal of comparative neurology* 521, 3992-4026.
- Perisse, E., Yin, Y., Lin, A.C., Lin, S., Huetteroth, W., and Waddell, S. (2013). Different kenyon cell populations drive learned approach and avoidance in *Drosophila*. *Neuron* 79, 945-956.
- Pfeiffer, B.D., Ngo, T.T., Hibbard, K.L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J.W., and Rubin, G.M. (2010). Refinement of tools for targeted gene expression in

Drosophila. Genetics 186, 735-755.

Pfeiffer, B.D., Truman, J.W., and Rubin, G.M. (2012). Using translational enhancers to increase transgene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6626-6631.

Philips, G.T., Kopec, A.M., and Carew, T.J. (2013). Pattern and predictability in memory formation: from molecular mechanisms to clinical relevance. *Neurobiol Learn Mem* 105, 117-124.

Pitman, J.L., Huetteroth, W., Burke, C.J., Krashes, M.J., Lai, S.L., Lee, T., and Waddell, S. (2011). A pair of inhibitory neurons are required to sustain labile memory in the *Drosophila* mushroom body. *Current biology* 21, 855-861.

Placais, P.Y., and Preat, T. (2013). To favor survival under food shortage, the brain disables costly memory. *Science* 339, 440-442.

Placais, P.Y., Trannoy, S., Friedrich, A.B., Tanimoto, H., and Preat, T. (2013). Two pairs of mushroom body efferent neurons are required for appetitive long-term memory retrieval in *Drosophila*. *Cell reports* 5, 769-780.

Placais, P.Y., Trannoy, S., Isabel, G., Aso, Y., Siwanowicz, I., Belliart-Guerin, G., Vernier, P., Birman, S., Tanimoto, H., and Preat, T. (2012). Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nature neuroscience* 15, 592-599.

Qin, H., Cressy, M., Li, W., Coravos, J.S., Izzi, S.A., and Dubnau, J. (2012). Gamma neurons mediate dopaminergic input during aversive olfactory memory formation in *Drosophila*. *Current biology* 22, 608-614.

Quinn, W.G., and Dudai, Y. (1976). Memory phases in *Drosophila*. *Nature* 262, 576-577.

Quinn, W.G., Harris, W.A., and Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 708-712.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., Medina, J.H., and Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325, 1017-1020.

Salcedo, E., Huber, A., Henrich, S., Chadwell, L.V., Chou, W.H., Paulsen, R.,

and Britt, S.G. (1999). Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 10716-10726.

Schnaitmann, C., Vogt, K., Triphan, T., and Tanimoto, H. (2010). Appetitive and aversive visual learning in freely moving *Drosophila*. *Frontiers in behavioral neuroscience* 4, 10.

Schultz, W. (2013). Updating dopamine reward signals. *Current opinion in neurobiology* 23, 229-238.

Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., and Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 10495-10502.

Sejourne, J., Placais, P.Y., Aso, Y., Siwanowicz, I., Trannoy, S., Thoma, V., Tedjakumala, S.R., Rubin, G.M., Tchenio, P., Ito, K., *et al.* (2011). Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nature neuroscience* 14, 903-910.

Siegel, R.W., and Hall, J.C. (1979). Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3430-3434.

Stach, S., and Giurfa, M. (2005). The influence of training length on generalization of visual feature assemblies in honeybees. *Behav Brain Res* 161, 8-17.

Szuts, D., and Bienz, M. (2000). LexA chimeras reveal the function of *Drosophila* Fos as a context-dependent transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5351-5356.

Tanaka, N.K., Tanimoto, H., and Ito, K. (2008). Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of comparative neurology* 508, 711-755.

Tanimoto, H., Heisenberg, M., and Gerber, B. (2004). Experimental

psychology: event timing turns punishment to reward. *Nature* 430, 983.

Tempel, B.L., Livingstone, M.S., and Quinn, W.G. (1984). Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3577-3581.

Tomchik, S.M., and Davis, R.L. (2009). Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the *Drosophila* olfactory pathway. *Neuron* 64, 510-521.

Tomer, R., Denes, A.S., Tessmar-Raible, K., and Arendt, D. (2010). Profiling by image registration reveals common origin of annelid mushroom bodies and vertebrate pallium. *Cell* 142, 800-809.

Trannoy, S., Redt-Clouet, C., Dura, J.M., and Preat, T. (2011). Parallel processing of appetitive short- and long-term memories in *Drosophila*. *Current biology* 21, 1647-1653.

Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., and Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 35-47.

Tully, T., and Quinn, W.G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157, 263-277.

Turner, G.C., Bazhenov, M., and Laurent, G. (2008). Olfactory representations by *Drosophila* mushroom body neurons. *Journal of neurophysiology* 99, 734-746.

Viswanathan, S., Williams, M.E., Bloss, E.B., Stasevich, T.J., Speer, C.M., Nern, A., Pfeiffer, B.D., Hooks, B.M., Li, W.P., English, B.P., *et al.* (2015). High-performance probes for light and electron microscopy. *Nature methods* 12, 568-576.

Vogt, K., Schnaitmann, C., Dylla, K.V., Knapek, S., Aso, Y., Rubin, G.M., and Tanimoto, H. (2014). Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. *eLife* 3, e02395.

Waddell, S. (2013). Reinforcement signalling in *Drosophila*; dopamine does it all after all. *Current opinion in neurobiology* 23, 324-329.

Wiltgen, B.J., and Silva, A.J. (2007). Memory for context becomes less specific with time. *Learning & memory* 14, 313-317.

Yamagata, N., Ichinose, T., Aso, Y., Placais, P.Y., Friedrich, A.B., Sima, R.J.,

- Preat, T., Rubin, G.M., and Tanimoto, H. (2015). Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 578-583.
- Yang, M.Y., Armstrong, J.D., Vilinsky, I., Strausfeld, N.J., and Kaiser, K. (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* 15, 45-54.
- Yu, D., Akalal, D.B., and Davis, R.L. (2006). *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* 52, 845-855.
- Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., and Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288, 672-675.